



UNIVERSIDADE DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

**A POLIHEXANIDA NO CONTROLO DE INFEÇÕES BACTERIANAS E POR
MALASSEZIA: ESTUDO CLÍNICO PRELIMINAR NO CÃO**

JOANA RAQUEL DUARTE CARDOSO

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutora Maria Constança Matias Ferreira Pomba
Doutora Berta Maria Fernandes Ferreira São Braz
Doutora Ana Mafalda Gonçalves Xavier Félix Lourenço

ORIENTADORA

Doutora Ana Mafalda Gonçalves
Xavier Félix Lourenço

2017

LISBOA



UNIVERSIDADE DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

**A POLIHEXANIDA NO CONTROLO DE INFEÇÕES BACTERIANAS E POR
MALASSEZIA: ESTUDO CLÍNICO PRELIMINAR NO CÃO**

JOANA RAQUEL DUARTE CARDOSO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutora Maria Constança Matias Ferreira Pomba

Doutora Berta Maria Fernandes Ferreira São Braz

Doutora Ana Mafalda Gonçalves Xavier Félix Lourenço

ORIENTADORA

Doutora Ana Mafalda Gonçalves

Xavier Félix Lourenço

2017

LISBOA

Aos meus pais e irmã

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora de estágio, a Professora Doutora Ana Mafalda Lourenço, um imenso e risonho obrigada. Obrigada por me incentivares na procura do meu projeto especial e por me ajudares a construí-lo. Por me guiares através das dúvidas e receios e seres uma força serena em momentos incertos. Por toda a confiança que sei que depositaste em mim. Pela dedicação que pões em tudo e todos, na profissão, nos doentes e nos teus estagiários. Por puxares sempre por mim, questionares e dares liberdade na aprendizagem. Por seres uma mentora fantástica, que me ensinou tanto... de dermatologia, de medicina e de coisas da vida. Pela partilha, pelas palavras motivadoras, pelo companheirismo e pela amizade. Por nunca desistires.

À Professora Doutora Berta São Braz, por todo o apoio ao longo deste projeto, esse apoio pronto e despachado. Por toda a ajuda com a burocracia naquele início de estágio conturbado. Pela ajuda fundamental a conseguir os meios necessários para o projeto seguir em frente através do contacto com a B. Braun Medical, Lda. Pela energia e motivação que transmitia sempre que nos cruzávamos nos corredores.

À B. Braun Medical, Lda, pelo gosto que demonstrou em contribuir para este projeto e do qual sobreveio o imprescindível patrocínio dos produtos utilizados neste ensaio clínico. Eternamente grata.

À ACIVET – Associação para o Desenvolvimento das Ciências Veterinárias, que deu também um contributo importante através do patrocínio das embalagens distribuídas aos participantes e à empresa P.S.A. Plast – Plásticos Santo António, Lda que, generosamente, acedeu a uma encomenda mais pequena que o habitual e foi pronta no envio da mesma.

A todos as pessoas que participaram neste projeto com os seus cães. Um enorme agradecimento, pois sem vós este projeto não teria propósito e seria impossível de concretizar.

Ao Professor Doutor Telmo Pina Nunes, pelo gosto em ajudar todos os alunos que lhe batem à porta. Por ser tão paciente nos ensinamentos da estatística e não nos deixar a nós, estagiários, desesperar. E por algumas palavras importantes em momentos complicados.

Ao Professor Doutor José Henrique Duarte Correia, pela boa disposição da vizinhança do gabinete da minha orientadora e algumas palavras sábias e reconfortantes.

À Doutora Natacha Couto, pela introdução às resistências aos antibióticos no início do estágio e pela força que me transmitiu mesmo nas poucas vezes que nos vimos já na etapa final. À Engenheira Adriana Belas, pela simpatia e disponibilidade que sempre demonstrou com as minhas questões sobre as culturas bacterianas dos “meus” doentes.

A todos aqueles no Hospital Escolar, pois contribuíram para o meu crescimento no estágio e durante o projeto. Muito obrigada.

À Lúcia Sales e à Emi Maruhashi, um agradecimento muito especial por me receberem tão bem na Dermatologia e à Susana Silva que depois se lhes juntou. Um tremendo “obrigada” pela amizade franca, apoio e carinho. Por tornarem a dermatologia ainda mais divertida. À Sílvia Ferreira e à Susana Ferreira, que por sua vez tornaram a neurologia ainda mais divertida e que sempre me deram palavras de força para terminar este curso.

Às minhas amigas incondicionais, Daniela Ferreira e Sandra Pires. As muitas palavras que vos possa dizer serão sempre poucas para expressar o quão especiais se tornaram depois do nosso primeiro encontro para aquele trabalho de anatomia. Obrigada por serem vocês, como são. E a todos os meus amigos e colegas de curso, por terem partilhado esta jornada comigo e por todas as boas memórias que deixaram. Um agradecimento especial ao David Otero, ao André Beselga e à Íris Carvalho. À Marisa Matos e à Joana Geirinhas, minhas amigas de infância. Por todos os momentos de quando éramos pequenas e adolescentes, mas sobretudo por continuarem aí, por muito que o tempo ou a distância estiquem, encolham e voltem a esticar e a encolher. À Tininha, a minha querida amiga além-mar. Obrigada por andares por aí.

Ao meu amigo e professor de piano José Azevedo de Souza, que sempre acreditou em mim e mo disse vezes sem conta. E a todas as “pessoas da música” daqueles anos que estão lá atrás.

To June and Peter for saving me in Neston. Thank you for taking me with you everywhere and the wonderful time we spent. Thank you for the support and love.

A ti, pai. Estejas onde estiveres nessa cortina brilhante do Universo, sei que estás orgulhoso de mim. A ti, mãe, por cuidares de mim como só tu o sabes fazer. Pelo apoio que tu e o pai sempre me deram em tudo. Obrigada por esse teu dom de mãe. Pela tua paciência e pelas tuas garreias. Por me socorreres sempre que preciso e por essas tuas palavras sábias. Mana, querida, obrigada por seres minha companheira, amiga e confidente. Por todo o apoio nas tantas horas difíceis. Por seres a mana linda que és. Ao meu tio, que sempre torceu por mim, obrigada querido tio. À minha avó Natércia, por dar toda a força à netinha para que acabasse o curso. À minha avó Maria. À melhor família na qual poderia ter nascido, a qual carrego sempre comigo e que fez de mim o que sou.

Ao meu namorado, Bruno Esperanço, por teres sido, nestes últimos anos, a rocha sólida à qual me agarrei e que nunca me deixou afundar. Por teres estado e estares lá, sempre, para mim e me ajudares em tudo, no bom e no mau. Por me ouvires e secares as lágrimas e me relembrares de que sou sempre capaz. Por aturares a minha rabugice como ninguém.

“A POLIHEXANIDA NO CONTROLO DE INFEÇÕES BACTERIANAS E POR *MALASSEZIA*: ESTUDO CLÍNICO PRELIMINAR NO CÃO”

As piодermites são consideradas as doenças de pele mais frequentes no cão e a dermatite por *Malassezia* é cada vez mais relevante. O problema das resistências aos antimicrobianos e, em especial, dos estafilococos multirresistentes, tanto em Saúde Animal como em Saúde Humana, torna as opções terapêuticas sistêmicas limitadas, imperando uma necessidade de gestão e preservação dos antimicrobianos disponíveis, de pesquisa de alternativas e de proteção da saúde pública. A terapêutica tópica é, assim, cada vez mais privilegiada, sendo a clorexidina o antisséptico mais usado na Dermatologia Veterinária. Já em Medicina Humana a polihexanida é o antisséptico de primeira linha no tratamento de feridas infetadas. Assim, este ensaio clínico randomizado e controlado pretendeu investigar a eficácia de uma solução de polihexanida a 0,1% (Prontosan®, B.Braun Medical, Lda, Portugal) no tratamento de infeções de pele bacterianas e/ou por *Malassezia* no cão, aplicada uma vez por dia, num máximo de seis semanas e, adicionalmente, comparar essa eficácia à de uma solução de digluconato de clorexidina a 2%. A resposta ao tratamento foi definida pela progressão de um *score* clínico e citológico atribuídos segundo escalas de, respetivamente, três e quatro pontos, sendo também registada a opinião dos donos. Com a utilização da polihexanida foi observada uma melhoria clínica em 75% (6/8) dos doentes com pelo menos uma consulta de seguimento vs. 60% (6/10) no grupo da clorexidina. Houve uma melhoria clínica de pelo menos 50% associada a cura citológica em metade dos doentes tratados com polihexanida, que alcançaram a cura clínica entre os 14 e 31 dias vs. 21 dias para o único doente que atingiu cura clínica com a clorexidina. A cura citológica foi mais frequente que a cura clínica em ambos os grupos e ocorreu entre os dias 7 e 24 para a polihexanida vs. 8 e 22 para a clorexidina. Os resultados sugerem que a polihexanida é eficaz no tratamento de algumas piодermites, com ou sem sobrecrecimento de *Malassezia*, sendo muito bem tolerada. A sua eficácia parece ser pelo menos semelhante à da clorexidina e, além disso, não se observaram reações adversas. Isto pode indicar uma vantagem sobre a clorexidina, que, neste estudo, esteve implicada numa dermatite de contacto. A investigação relativa à polihexanida nesta área pode e deve continuar. Considerando os seus atributos de promoção da cicatrização e os resultados positivos deste estudo seria importante avaliar a sua utilização em piодermites profundas. Há, todavia, uma grande falta de conhecimento sobre as consequências da exposição prolongada e subterapêutica dos microrganismos a estes antissépticos.

Palavras-chave: polihexanida, infeções cutâneas, piодermite, *Malassezia*, tratamento tópico, ensaio clínico.

ABSTRACT

“POLYHEXANIDE IN THE TREATMENT OF PYODERMA AND *MALASSEZIA* DERMATITIS: PRELIMINARY CLINICAL TRIAL IN THE DOG”

Pyoderma is considered the most frequent skin disease in the dog and *Malassezia* dermatitis is increasingly relevant. The problem of antimicrobial resistance and specially the multiresistant staphylococci in both Animal and Human Health makes systemic treatment options more and more limited prevailing a need for stewardship and preservation of the current available antimicrobials, alternatives research and protection of public health. Topical therapy is, thus, progressively privileged being chlorhexidine the most used antiseptic in Veterinary Dermatology. Regarding Human Medicine, polyhexanide is the first-line antiseptic for topical treatment of infected wounds. Hence, this randomized controlled clinical trial intended to investigate the efficacy of a 0,1% polyhexanide solution (Prontosan®, B.Braun Medical, Lda, Portugal) in the treatment of bacterial and/or *Malassezia* skin infections in the dog applied once a day for a maximum of six weeks and, additionally, to compare it with a 2% chlorhexidine digluconate solution. Treatment response was based on the progression of the clinical and cytological scores assigned according to a three and four point scale, respectively, and also on owner feedback. There was a clinical improvement with polyhexanide in 75% (6/8) of the patients with at least one follow-up consultation vs. 60% (6/10) in chlorhexidine's group. There was a clinical improvement of at least 50% associated with cytological cure in half the patients treated with polyhexanide, which then attained clinical cure between days 14 and 31 vs. day 21 for the only patient that attained clinical cure with chlorhexidine. Cytological cure was more common than clinical cure in both groups and occurred between days 7 and 24 for polyhexanide vs. days 8 to 22 for chlorhexidine. Results suggest that polyhexanide is effective in the treatment of some pyodermas with or without *Malassezia* overgrowth, being very well tolerated. Its efficacy seems to be at least similar to chlorhexidine's plus no adverse reactions were observed. This might indicate an advantage over chlorhexidine, which in this study was implicated in a contact dermatitis. Further investigation is warranted and should continue. Considering polyhexanide's attributes on wound healing and the positive results of this study it would be important to evaluate its usage in deep pyoderma. There is, however, a big lack of knowledge about the consequences of prolonged and subtherapeutic exposure of microorganisms to these antiseptics.

Keywords: polyhexanide, skin infections, pyoderma, *Malassezia*, topical treatment, clinical trial.

ÍNDICE

RESUMO.....	iii
ABSTRACT	iv
ÍNDICE.....	v
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	xi
I – INTRODUÇÃO	1
1. RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR	1
1.1. Medicina.....	1
1.2. Cirurgia.....	2
1.3. Imagiologia.....	2
1.4. Internamento de pequenos animais	2
1.5. Dermatologia.....	3
1.6. Lições importantes	4
2. DESENVOLVIMENTO DO PROJETO DE TESE DE MESTRADO.....	5
II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
1. INFEÇÃO CUTÂNEA NO CÃO.....	6
1.1. Prevalência	6
1.1.1. Prevalência global das doenças dermatológicas	6
1.1.2. Prevalência das infecções cutâneas	6
1.2. Breves noções anatómicas da pele	7
1.3. Uma barreira inata.....	8
1.4. Microbiota bacteriana.....	9
1.5. Microbiota fúngica – o caso particular do género <i>Malassezia</i>	10
1.6. Diagnóstico citológico de infecção	10
1.7. Piodermites.....	12
1.7.1. Agentes etiológicos.....	12
1.7.2. Fisiopatologia da infecção por estafilococos	12
1.7.3. Classificação	13
1.7.4. O problema das resistências.....	17
1.7.5. Tratamento tópico das piodermites	20
1.8. Dermatite por <i>Malassezia</i>	29
1.8.1. Fisiopatologia da infecção por <i>Malassezia</i>	29
1.8.2. Sinais clínicos	30
1.8.3. Papel da clorexidina na dermatite por <i>Malassezia</i>	30
2. POLIHEXANIDA	33
2.1. Variabilidade química	33
2.2. Ação antimicrobiana	33
2.2.1. Espectro de ação	33
2.2.2. Mecanismos de ação	34
2.3. O que distingue a polihexanida?	35
2.3.1. Principais vantagens.....	35
2.3.2. Outras características importantes	36
2.4. Utilização em Medicina Humana	37
2.4.1. Indicações e contraindicações.....	37
2.4.2. Questões práticas	37
2.4.3. Toxicidade e reações adversas	38

2.5. Utilização em Medicina Veterinária	39
2.6. Prontosan®	40
2.6.1. Ação antimicrobiana <i>in vitro</i>	41
2.6.2. Exemplos práticos da sua aplicação	42
III – A POLIHEXANIDA NO CONTROLO DE INFECÇÕES BACTERIANAS E POR MALASSEZIA: ESTUDO CLÍNICO PRELIMINAR NO CÃO	43
1. OBJETIVOS	43
2. MATERIAIS E MÉTODOS	43
2.1. Introdução	43
2.2. Desenho experimental	43
2.3. Preparação da solução de clorexidina	45
2.4. Elegibilidade	45
2.5. Diagnóstico de infeção cutânea	45
2.6. Protocolo de tratamento	46
2.6.1. Modo e frequência de aplicação	46
2.6.2. Duração	46
2.6.3. Tratamentos concomitantes	47
2.6.4. Seguimento clínico	47
2.7. Bacteriologia	48
2.8. Indicadores primários – avaliação da eficácia clínica	48
2.8.1. <i>Score</i> clínico	48
2.8.2. <i>Score</i> citológico	49
2.9. Indicadores secundários	50
2.9.1. Grau de prurido	50
2.9.2. Registo fotográfico e avaliação subjetiva da melhoria clínica	50
2.9.3. Questionário global de participação	50
2.10. Agravamento do estado clínico	51
2.11. Reações adversas	51
2.12. Abandono ou retirada – <i>dropouts</i>	52
2.12.1. Abandono ou escolha voluntária	52
2.12.2. Retirada	52
2.13. Planeamento da análise de resultados e métodos estatísticos	52
3. RESULTADOS	54
3.1. Caracterização da amostra	54
3.1.1. Caracterização quanto à infeção	56
3.2. Cultura bacteriana e teste de suscetibilidade a antibióticos	59
3.3. Avaliação dos indicadores primários	61
3.3.1. Verificação de concordância entre as observadoras	61
3.3.2. <i>Scores</i> clínicos e citológicos antes do início do tratamento	63
3.3.3. <i>Dropouts</i>	63
3.3.4. Progressão clínica	64
3.3.5. Progressão citológica	67
3.4. Avaliação dos indicadores secundários	70
3.4.1. Grau de prurido	70
3.4.2. Questionários	71
4. DISCUSSÃO	74
4.1. Visão global	74
4.2. Análise de eficácia	74
4.2.1. Randomização	74
4.2.2. Progressão clínica e citológica	74

4.2.3.	<i>Dropouts</i>	81
4.2.4.	Reações adversas	81
4.3.	Bacteriologia vs. resposta ao tratamento	86
4.3.1.	Citologia <i>versus</i> cultura bacteriana	86
4.3.2.	Perfis de suscetibilidade a antibióticos <i>versus</i> resposta ao tratamento	87
4.4.	Suscetibilidade bacteriana aos biocidas utilizados	87
4.4.1.	Suscetibilidade <i>versus</i> resistência à clorexidina	87
4.4.2.	Suscetibilidade <i>versus</i> resistência à polihexanida	90
4.4.3.	Falha terapêutica – papel dos antissépticos utilizados	91
4.5.	Algumas limitações e aspetos a melhorar	91
4.5.1.	Crítérios de elegibilidade	91
4.5.2.	População de estudo	94
4.5.3.	Protocolo de tratamento	95
4.5.4.	Escalas de avaliação utilizadas	97
4.5.5.	Planeamento do desenho experimental	100
4.6.	Outras considerações	100
4.6.1.	Concordância entre observadoras	100
4.7.	Problemas das infeções cutâneas	102
4.7.1.	Para o doente	102
4.7.2.	Para aqueles que convivem regularmente com o doente	102
4.7.3.	Para o médico-veterinário	103
5.	CONCLUSÕES	104
6.	PERSPETIVAS FUTURAS	105
	BIBLIOGRAFIA	107
	ANEXOS	134
	ANEXO 1 – Apresentação criada para divulgação do projeto no Hospital Escolar da FMV-ULisboa (pp. 1, 20 e 26)	134
	ANEXO 2 – Termo de consentimento informado	135
	ANEXO 3 – Ficha de registo do <i>score</i> clínico.	136
	ANEXO 4 – Ficha para avaliação do grau de prurido.	137
	ANEXO 5 – Questionário individual para avaliação da melhoria clínica.	138
	ANEXO 6 – Questionário geral relativo à participação no projeto.	139
	ANEXO 7 – Caracterização geral dos doentes.	141
	ANEXO 8 – Caracterização dos doentes quanto a doenças concomitantes.	142
	ANEXO 9 – Caracterização da infeção cutânea de cada doente no dia 0 do tratamento. ..	143
	ANEXO 10 – Comparação dos resultados da citologia (dia 0) e da cultura bacteriana.	144
	ANEXO 11 – Perfil de suscetibilidade a antibióticos das estirpes recolhidas	145
	ANEXO 12 – Registo dos <i>scores</i> clínicos atribuídos pela estagiária para os quais existia um correspondente <i>score</i> clínico atribuído pela orientadora, refletindo o mesmo doente avaliado no mesmo dia.	146
	ANEXO 13 – Progressão do <i>score</i> clínico (N=19)	147
	ANEXO 14 – Progressão do <i>score</i> citológico (N=19)	149
	ANEXO 15 – Exame citológico (N=19)	151
	ANEXO 16 – Progressão do grau prurido (N=19).	153
	ANEXO 17 – Estudo de casos: utilização do Prontosan® solução no tratamento tópico de dois doentes com granuloma acral por lambedura	155

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Lesões de foliculite bacteriana superficial (fotografias da autora)	16
Figura 2 – Foliculite bacteriana superficial – padrão “roído por traças” (fotografias da autora)	16
Figura 3 – Piodermite superficial esfoliativa numa cadela da raça Buldogue Francês – região axilar (fotografias da autora)	17
Figura 4 – Resultados mais antigos da pesquisa na PubMed® por <i>antimicrobial/antibiotic resistance</i>	18
Figura 5 – Dermatite por <i>Malassezia</i> (DM) vs. piodermite (fotografias da autora)	31
Figura 6 – Ação do Prontosan® em biofilmes (Bradbury & Fletcher, 2011). Imagem reproduzida com permissão da <i>Wounds International</i>	41
Figura 7 – Prontosan® solução aplicado numa úlcera da perna com 17 meses de duração num doente com doença venosa crónica – ferida infetada, sem melhorias com antibiótico e pensos de prata e carvão ativado. Imagens reproduzidas com permissão da B. Braun (<i>B. Braun European Case Study Booklet (2010): Effectiveness of Prontosan® Solution and Gel on variety of wounds types</i> , pp. 64-65, http://www.prontosan.co.uk/casestudies.html).....	42
Figura 8 – Prontosan® solução aplicado numa ferida da perna com 4 meses de duração, infetada e sem melhorias na cicatrização com a utilização de um penso de prata iónica. Imagens reproduzidas com permissão da B. Braun (<i>B. Braun European Case Study Booklet (2010): Effectiveness of Prontosan® Solution and Gel on variety of wounds types</i> , pp. 66-67, http://www.prontosan.co.uk/casestudies.html)	42
Figura 9 – Braços do estudo.....	44
Figura 10 – Processo de revestimento dos frascos que continham quer a polihexanida a 0,1% quer a clorexidina a 2%	44
Figura 11 – Sexo e estado reprodutivo dos doentes por grupo de tratamento (N=18)	55
Figura 12 – Distribuição das raças dos doentes por grupo de tratamento (N=18)	55
Figura 13 – Doenças predisponentes a infeção cutânea nos doentes incluídos (N=18)	56
Figura 14 – Distribuição dos doentes por grupo de tratamento consoante o carácter inicial ou recorrente da infeção (N=19)	57
Figura 15 – Distribuição dos doentes com foliculite bacteriana e dermatite por <i>Malassezia</i> (DM) de acordo com o grupo de tratamento.....	57
Figura 16 – Visão global da distribuição das regiões corporais afetadas na amostra (N=19) e por grupo de tratamento.....	58
Figura 17 – Distribuição dos isolados bacterianos (N=13) por grupo de tratamento de acordo com o seu perfil de suscetibilidade a antibióticos.....	60
Figura 18 – Visão global da suscetibilidade a antibióticos dos isolados estafilocócicos obtidos (N=12)	61
Figura 19 – Gráfico Bland-Altman para investigar a concordância entre as observadoras, considerando medições repetidas: diferença entre as medições de <i>score</i> clínico de ambas vs. a média dessas medições.....	62
Figura 20 – Suspeita de reação adversa à clorexidina na doente n.º 10, com eritema moderado a intenso e descamação em placas; prurido muito intenso associado (fotografias gentilmente cedidas pela colega Susana Silva)	64
Figura 21 – Diagramas de extremos e quartis: diferenças de <i>score</i> clínico entre T0 e T3 consoante os grupos de tratamento.....	65
Figura 22 – Diagramas de extremos e quartis: progressão do <i>score</i> clínico de T0 a T3 (T0, T1, T2, T3) consoante os grupos de tratamento.....	65
Figura 23 – Análise de sobrevivência de Kaplan-Meier para comparar o tempo até redução de pelo menos 50% do <i>score</i> clínico e concomitante resolução citológica da infeção	66
Figura 24 – Análise de sobrevivência de Kaplan-Meier para comparar o tempo até cura clínica.....	67

Figura 25 – Diagramas de extremos e quartis: diferenças de <i>score</i> citológico entre T0 e T3 consoante os grupos de tratamento.....	68
Figura 26 – Diagramas de extremos e quartis: progressão do <i>score</i> citológico de T0 a T3 (T0, T1, T2, T3) consoante os grupos de tratamento.....	68
Figura 27 – Análise de sobrevivência de Kaplan-Meier para comparar o tempo até cura citológica.....	69
Figura 28 – Diagramas de extremos e quartis: progressão do grau de prurido de T0 a T3 (T0, T1, T2, T3) consoante os grupos de tratamento.....	70
Figura 29 – Diagramas de extremos e quartis: diferenças do prurido entre T0 e T3 consoante os grupos de tratamento.....	71
Figura 30 – Avaliação quantitativa do grau de melhoria das lesões de pele no fim do tratamento em comparação ao dia zero (amostra total, N=15; grupo Clor, n=9; grupo P, n=6)	71
Figura 31 – Avaliação qualitativa do grau de melhoria das lesões de pele no final do tratamento em comparação ao dia zero (amostra total, N=15; grupo Clor, n=9; grupo P, n=6)	72
Figura 32 – Respostas dos participantes ao questionário geral (N=15)	73
Figura 33 – Exemplo de melhoria clínica equivalente a uma redução do <i>score</i> clínico inferior a 50%, mas ainda assim evidente – doente n.º 4 (fotografias da autora)	75
Figura 34 – Doente n.º 9 seis dias depois da suspensão da clorexidina (fotografias da autora)...	85
Figura 35 – Granuloma acral por lambedura no membro torácico direito (fotografias da autora)	157
Figura 36 – Intervalo de tempo (em n.º de dias) entre consultas de reavaliação; início do Prontosan® solução no dia da primeira consulta (consulta 1, indicada pela seta cor de laranja)	158
Figura 37 – Granuloma acral por lambedura no membro torácico direito – progressão da lesão na região cubital, face medial (fotografias da autora).....	160
Figura 38 – Mesma lesão da Figura 37 com a evolução do tratamento (fotografias da autora).....	161
Figura 39 – Mesma lesão das Figuras 37 e 38 (fotografias da autora)	162
Figura 40 – Evolução muito desfavorável da lesão na região antebraquial (fotografia da autora)	163
Figura 41 – Granuloma acral por lambedura no membro pélvico direito (A e C) e lesão remanescente no membro pélvico esquerdo (B) (fotografias da autora)	164
Figura 42 – Granuloma acral por lambedura no membro pélvico direito – primeiros dias do tratamento (fotografias gentilmente cedidas pela pessoa responsável pelo doente)	166
Figura 43 – Granuloma acral por lambedura no membro pélvico direito – evolução ao longo das primeiras três semanas de tratamento (fotografias da autora)	167
Figura 44 – Granuloma acral por lambedura no membro pélvico direito – cerca de 10 meses após o término do Prontosan® solução (fotografias gentilmente cedidas pela pessoa responsável pelo doente)	168

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores considerados normais para as bactérias e tendencialmente razoáveis para as leveduras <i>Malassezia</i> na avaliação citológica quantitativa de amostras cutâneas em cães.....	11
Tabela 2 – Índice de biocompatibilidade para alguns antissépticos – tradução livre da tabela 1 do artigo de Eberlein e Assadian (2010), complementada com dados de Müller e Kramer (2008)	36
Tabela 3 – Dados toxicológicos exploratórios dos antissépticos mais comuns em comparação com a polihexanida – tradução livre da tabela 3 do artigo de Kaehn (2010)	38
Tabela 4 – Critérios de elegibilidade.....	45
Tabela 5 – Método semiquantitativo para descrever os resultados do exame citológico – tradução livre, tal como descrito por Budach e Mueller (2012)	49

Tabela 6 – Estatística descritiva relativa à idade e ao peso dos doentes na amostra total (N=18) e por grupo de tratamento (grupo Clor, n=10; grupo P, n=8)	54
Tabela 7 – Distribuição dos doentes na globalidade da amostra e por grupo de tratamento consoante o tipo de agente etiológico envolvido; n.º de doentes (frequência relativa, %)	56
Tabela 8 – N.º de ocorrências (frequência relativa, %) das regiões corporais afetadas nos doentes com foliculite e naqueles com dermatite por <i>Malassezia</i> (DM)	58
Tabela 9 – N.º de ocorrências (frequência relativa, %) das diferentes lesões cutâneas na globalidade da amostra (N=19) e, particularmente, nos doentes com foliculite e naqueles com dermatite por <i>Malassezia</i> (DM) – não incluído o registo das lesões com apenas uma ocorrência no total da amostra.....	59
Tabela 10 – Análise do <i>score</i> clínico e do <i>score</i> citológico na amostra total (N=19) e por grupo de tratamento (grupo Clor, n=10; grupo P, n=9), em T0.....	63
Tabela 11 – Observações possíveis resultantes da interação das bactérias com a clorexidina – tradução livre da tabela 2 do artigo de Horner et al. (2012)	88

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

CADESI-3	<i>Canine Atopic Dermatitis Extent and Severity Index – third version</i>
CADESI-4	<i>Canine Atopic Dermatitis Extent and Severity Index – fourth version</i>
CBM	Concentração bactericida mínima
CFM	Concentração fungicida mínima
CIM	Concentração inibitória mínima
DAMPs	<i>Damage/Danger-associated molecular patterns</i>
DAPP	Dermatite alérgica à picada da pulga
DCA	Dermatite de contacto alérgica
DCI	Dermatite de contacto irritativa
EMRSA-15	<i>Epidemic methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i> 15 (clone epidémico)
i.e.	“Isto é”, do latim <i>id est</i>
ISCAID	<i>International Society for Companion Animal Infectious Diseases</i> (Sociedade Internacional para as Doenças Infecciosas dos Animais de Companhia)
FAO	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura
FeLV	<i>Feline Leukemia Virus</i> (Vírus da Leucemia Felina)
FIV	<i>Feline Immunodeficiency Virus</i> (Vírus da Imunodeficiência Felina)
FMV-ULisboa	Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa
IC _{95%}	Intervalo de confiança a 95%
<i>IQR</i>	<i>Interquartile range</i> (amplitude interquartil)
kg	Quilograma
L	Litro
LRAB	Laboratório de Resistência aos Antibióticos e Biocidas
<i>M</i>	Média
máx.	Máximo
<i>Mdn</i>	Mediana
mg	Miligrama
mín.	Mínimo
mL	Mililitro
MRSA	<i>Methicillin-resistant S. aureus</i> (<i>S. aureus</i> resistente à metilina)
MRSP	<i>Methicillin-resistant Staphylococcus pseudintermedius</i> (<i>S. pseudintermedius</i> resistente à metilina)
MSSA	<i>Methicillin-susceptible S. aureus</i> (<i>S. aureus</i> suscetível à metilina)
MSSP	<i>Methicillin-susceptible S. pseudintermedius</i> (<i>S. pseudintermedius</i> suscetível à metilina)
NK	Linfócitos <i>natural killer</i>
OIE	Organização Mundial para a Saúde Animal
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAMPs	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
PRRs	<i>Pattern recognition receptors</i>
<i>qac</i>	<i>Quaternary ammonium compounds</i>
RAA	Reação adversa ao alimento
<i>s</i>	Desvio padrão
SIG	<i>Staphylococcus intermedius group</i> (grupo de <i>Staphylococcus intermedius</i> , GSI)
TSA	Teste de suscetibilidade a antibióticos
tx	Tratamento
UFC	Unidades formadoras de colónias
vs.	“Contra”, do latim <i>versus</i>

I – INTRODUÇÃO

A escolha da área de dermatologia como área a aprofundar e na qual desenvolver o trabalho de fim de curso foi o resultado curioso de vários acontecimentos espaçados no tempo que criaram a semente para os primeiros passos neste projeto. A estagiária teve uma oportunidade única para efetuar um estágio profissional ao abrigo do Programa Erasmus *Student Mobility for Placements*, no Hospital Escolar de Pequenos Animais da Universidade de Liverpool (*Small Animal Teaching Hospital – University of Liverpool*), entre 1 de Julho e 30 de Setembro de 2013, tendo dedicado as duas últimas semanas do estágio ao serviço de Dermatologia. Cresceu aqui um pequeno gosto até então nunca revelado, mas que se manteve em hibernação. Queria descobrir e aprender. A partir do momento em que foi aceite como estagiária pela Professora Doutora Ana Mafalda Lourenço, o gosto foi crescendo, crescendo até de forma surpreendente para a própria, que agora reconhece todo o peso e valor desta área que é a dermatologia. E tão engraçada!

1. RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR

O estágio curricular do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária decorreu no Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (FMV-ULisboa), sob orientação da Professora Doutora Ana Mafalda Lourenço. Um dos objetivos principais era a aquisição de competências e experiência na Medicina Geral, em consultas de primeira opinião, portanto foi planeado um estágio curricular com a duração de três meses, de 1 de Maio a 1 de Agosto de 2014, sendo a estagiária integrada nos serviços de Medicina, Cirurgia e Internamento de pequenos animais. Outro grande objetivo era a aquisição de competências em dermatologia, pelo que o acompanhamento das consultas da especialidade foi uma constante durante o período de estágio curricular oficial e, no âmbito do projeto de mestrado, manteve-se em exclusivo até meados de Julho de 2015.

1.1. MEDICINA

Os estagiários eram escalonados para o serviço de Medicina em turnos rotativos de 8 horas para o período da manhã ou para o período da tarde. Neste serviço, a estagiária foi sempre encorajada a desenvolver a sua autonomia e prática clínica de forma muito metódica, o que em tudo favoreceu a consolidação e aquisição de conhecimentos teóricos e práticos e da mecânica da prática em si. A estagiária assistiu a consultas de primeira e segunda opinião, consultas de reavaliação, consultas de doentes pediátricos, adultos e geriátricos e a todo um rol de estímulos iatrotrópicos. Mais, esteve envolvida em todo o processo clínico dos doentes desde a chamada para a sala de consulta, aos eventuais exames complementares e, por fim, ao fecho da consulta

e/ou encaminhamento para o internamento, assim como em todas as tarefas necessárias em consulta, como por exemplo, de forma mais rotineira, a contenção física dos doentes, a colheita de amostras de sangue e a colocação de cateteres venosos periféricos. A estagiária participou numa série de procedimentos médicos mais ou menos frequentes, de que são exemplo o manuseio de feridas traumáticas, algalias e medição da pressão arterial.

1.2. CIRURGIA

Os estagiários eram escalonados para o serviço de Cirurgia no total de uma semana por mês de estágio. Na maior parte das cirurgias, a estagiária assumiu o papel de anestesista ou assistente de cirurgião, tendo ficado responsável pelo doente na recuperação anestésica. Nas consultas pós-cirúrgicas, incluídas na consulta de Medicina Geral, adquiriu conhecimentos no manuseio de feridas cirúrgicas e praticou a remoção de pontos e mudança de pensos cirúrgicos. A estagiária participou sobretudo em cirurgias de tecidos moles, como ovariectomias eletivas e de urgência, orquiectomias, mastectomias e exérese de massas e nódulos, embora tenha assistido ainda a algumas cirurgias do foro traumatológico, essencialmente para resolução de fraturas. Sob supervisão, foi permitida a execução de uma orquiectomia, suturas de músculo e pele e pequenos procedimentos como destarizações e extração de dentes.

1.3. IMAGIOLOGIA

No período de estágio, não houve escalonamento específico para o serviço de Imagiologia, muito embora a estagiária tenha acompanhado este serviço em paralelo, devido às necessidades dos serviços de Medicina e Cirurgia. O serviço de Imagiologia inclui radiologia computadorizada, endoscopia, ecografia, ecocardiografia e tomografia axial computadorizada. A estagiária seguiu inúmeros doentes em vários exames imagiológicos, prestando auxílio no seu posicionamento e imobilização e, quando necessário, na monitorização anestésica.

1.4. INTERNAMENTO DE PEQUENOS ANIMAIS

No internamento, a estagiária completava sempre um ou dois turnos semanais, de 24 ou 12 horas, respetivamente. Competia à estagiária garantir o bem-estar dos doentes e o cumprimento das necessidades de higiene e alimentação, bem como observar e monitorizar os doentes e proceder ao registo dessas observações na ficha clínica e, ainda, prestar auxílio em todos os procedimentos médicos necessários. A estagiária prestou também auxílio em várias urgências médicas quer de doentes no serviço ambulatorio noturno, quer de doentes internados, inclusive no internamento de doentes com doenças infecciosas.

1.5. DERMATOLOGIA

As consultas de referência de Dermatologia ao cuidado da Professora Doutora Ana Mafalda Lourenço eram organizadas de forma a haver dois dias de consultas por semana, em que um dia era maioritariamente dedicado a consultas de primeira vez, normalmente mais exigentes no que respeita ao tempo dispendido, esforço diagnóstico e orientação terapêutica do que as consultas de seguimento, às quais era destinado um dia distinto. Nos dias de consultas eram, muitas vezes, inseridos exames médicos complementares, normalmente da parte da tarde, que podiam incluir biópsias de pele, testes cutâneos de alergia ou videotoscopias. Quando necessário, sobretudo em situações de urgência para o cliente e doente, eram também reservados outros períodos em diferentes dias da semana. A orientadora fomentou a autonomia clínica da estagiária desde sempre, tendo o percurso sido contínuo e crescente. Inicialmente, a estagiária tinha a seu cargo a recolha de uma anamnese detalhada, segundo uma lista pré-elaborada de perguntas, às quais podia acrescentar outras questões que entendesse pertinentes, expondo de seguida o caso à orientadora, que a partir daí dirigia a consulta, incluindo e questionando sempre a estagiária no exame dermatológico, na escolha dos exames complementares, discussão sobre os diagnósticos diferenciais mais prováveis e plano terapêutico, elaboração do relatório da consulta e, por fim, no esclarecimento ao cliente. Com o passar do tempo e evolução da aprendizagem, a estagiária adquiriu liberdade para efetuar os exames que considerasse necessários antes de expor o caso, elaborar integralmente o relatório da consulta e esclarecer o cliente quanto aos achados clínicos, diagnóstico e plano terapêutico proposto.

A componente prática relativa à seleção, execução e interpretação dos exames complementares de diagnóstico esteve fortemente presente ao longo do estágio. Os exames mais frequentemente executados foram a citologia cutânea/auricular e o tricograma, tendo este último sido uma redescoberta, pois tinha sido incutido, durante o curso, o conceito de que “na suspeita de *Demodex*, faz-se raspagem cutânea profunda”, mas, na maior parte das vezes, o tricograma é suficiente para o diagnóstico e monitorização inicial da resposta ao tratamento. Na presença de piodermite, com história de vários períodos de antibioterapia, era muitas vezes necessária cultura bacteriana e teste de suscetibilidade a antibióticos (TSA) com determinação da concentração inibitória mínima (CIM), pelo que a realização de zangarinas de pele foi também frequente. Ainda nos exames complementares, há que mencionar a biópsia de pele e os testes cutâneos de alergia, pois sendo procedimentos médicos relativamente frequentes, a estagiária adquiriu conhecimentos na prática de ambos. As videotoscopias foram relativamente comuns, o que permitiu à estagiária adquirir algumas noções práticas quanto ao videotoscópio, tendo também aprendido a reconhecer a membrana timpânica e sinais de rotura da mesma, lesões de otite e presença de massas ou corpos estranhos.

Numa parte ainda apreciável do universo de doentes da consulta de referência de Dermatologia é necessário fazer o despiste e manejo de doença endócrina, sobretudo de hipotireoidismo e de hiperadrenocorticismismo, pelo que a estagiária adquiriu competências teóricas e práticas também nessa área. Não deixou de surpreender a forma como o hipotireoidismo pode ser insidioso e camaleónico, não devendo ser esquecido, sobretudo quando há falha terapêutica.

Embora a presença de gatos na consulta de referência de Dermatologia tenha sido rara, ficou incutido na estagiária a importância do rastreio da toxoplasmose, além do FIV e do FeLV, em todos os gatos prestes a iniciar ciclosporina. Além disso, aprendeu que as manifestações dermatológicas no gato são bastante diferentes daquilo que se observa no cão e que a resposta dermatológica do gato a uma mesma doença pode variar muito, regra geral assumindo um de quatro padrões básicos: dermatite miliar, prurido da face, do pescoço ou dos pavilhões auriculares, complexo do granuloma eosinofílico ou alopecia autoinduzida.

A estagiária foi convidada a participar, juntamente com os colegas estagiários da Dermatologia, na organização do primeiro Curso de Dermatologia da FMV-ULisboa, nos dias 27 e 28 de Junho de 2015, pensado, estruturado e organizado pela orientadora, a Professora Doutora Ana Mafalda Lourenço e pelo Professor Doutor José Henrique Duarte Correia. Foi a primeira experiência em algo deste género, enriquecedora a todos os níveis.

1.6. LIÇÕES IMPORTANTES

Frequentemente, o plano ideal ou mais adequado pode não ser o plano mais razoável para aquele doente e aquela pessoa em concreto. A estagiária observou e aprendeu e tem a convicção de que no plano diagnóstico e terapêutico deve ser embutida uma boa dose de ponderação e de bom senso. Devemos ouvir o que realmente nos estão a dizer e ser perspicazes quando olhamos para a situação que está à nossa frente. A relação entre médico-veterinário e cliente é, realmente, muito importante. E cliente é o “dono” que nos procura. Na maioria das vezes quer ser ajudado. E, na maioria das vezes, o objetivo é comum a uma e outra parte e resume-se a dar conforto e qualidade de vida ao doente. Houve dois casos clínicos mais complicados que marcaram a estagiária e lhe ensinaram que, por vezes, é necessário rever tudo aquilo que se fez para trás no processo clínico e partir do pressuposto de que algo pode não acontecer exatamente da forma que se pensou – é necessário pensar de forma diferente, rever todas as provas. A isto, pode aliar-se também a necessidade de ultrapassar medos convencionais ou dogmas, estudar mais sobre a situação e arriscar, sobretudo quando no limiar da eutanásia e do desespero dos clientes.

2. DESENVOLVIMENTO DO PROJETO DE TESE DE MESTRADO

O tema do projeto de tese foi muito debatido entre a estagiária e ela própria, antes sequer de ser debatido com a orientadora. Esta ideia partiu de uma outra – o manejo de feridas – cuja pesquisa inicial se centrou em programas científicos e *abstracts* dos congressos mais recentes de Medicina Humana dedicados ao tema. Havia sempre referências à utilização da polihexanida no manejo de feridas (Dissemond et al., 2010; Eberlein et al., 2012), por exemplo, em úlceras de pressão (Wild et al., 2012), ou em queimaduras de 1.º ou 2.º grau (Daeschlein et al., 2007; Piatkowski, Drummer, Andriessen, Ulrich & Pallua, 2011). E esta “polihexanida” parecia ter propriedades que iam para lá da excelente ação antimicrobiana e notável biocompatibilidade. Teria também propriedades na regeneração e proliferação celular e na cicatrização de feridas (Eberlein & Assadian, 2010; Hübner & Kramer, 2010). Se originalmente a pesquisa se centrou naquilo que de mais recente se faz em Medicina Humana, rapidamente houve uma transição de ideias para aquilo que poderia ser feito em Medicina Veterinária. Só um artigo publicado fazia menção à polihexanida no contexto veterinário, de forma ainda muito embrionária, o artigo de Banovic, Bozic e Lemo (2013), que avaliaram a eficácia *in vitro* da polihexanida contra isolados de *Staphylococcus pseudintermedius*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Malassezia pachydermatis* com origem no cão, tendo a sua eficácia sido comparável à da clorexidina. Posteriormente, foram encontradas mais algumas referências, ainda assim escassas, essencialmente na medicina de animais exóticos, silvestres e de zoo. Se a primeira linha terapêutica nas infeções cutâneas superficiais ou feridas infetadas consistia, em tempos, em antibioterapia tópica (Lachapelle, 2014), o aumento das infeções por bactérias multirresistentes – por exemplo, *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), em Medicina Humana e *S. pseudintermedius* resistente à meticilina (MRSP), em Medicina Veterinária (Cain, 2013) – tem funcionado cada vez mais como alerta à necessidade de melhor gestão do uso dos antibióticos (Jeffers, 2013). É de forma a minimizar ou evitar o uso de antibióticos que os antissépticos mais recentes entram em linha de ação (Hübner & Kramer, 2010; Lachapelle, 2014). Em Medicina Veterinária, o antisséptico mais utilizado no tratamento de infeções bacterianas é a clorexidina. A questão levantou-se: seria a polihexanida eficaz *in vivo* no tratamento de infeções cutâneas nas quais estão, muitas vezes, implicados os mesmos agentes patogénicos testados *in vitro*? Poderia a polihexanida trazer algum benefício relativamente à clorexidina? Estava decidido o tema para o projeto.

A inclusão de doentes neste projeto dependeu quase exclusivamente da casuística da consulta de Dermatologia, pelo que foi necessário um período de vários meses após o estágio curricular oficial para reunir um número razoável de doentes. Apresenta-se aqui o trabalho resultante, esperando que seja um pequeno contributo na Medicina Veterinária, sabendo que foi certamente grande o contributo desta experiência – que foi todo este processo – para a estagiária.

II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. INFEÇÃO CUTÂNEA NO CÃO

As reflexões mais complexas partem sempre de noções ou apreciações mais simples. Se se pretende compreender os “porquês” e os “comos” da infecção cutânea, então é inevitável que se coloque a questão: o que é uma infecção? Segundo os microbiologistas, ocorre “infecção” quando um “parasita” cresce e se multiplica num organismo hospedeiro, podendo a infecção resultar ou não em doença clínica, sendo “parasita” um microrganismo que vive num hospedeiro e que dele depende metabolicamente (Willey, Sherwood & Woolverton, 2008). Esta visão tem apenas como base a relação hospedeiro-parasita e, entrelinhas, dá a entender um caráter invasivo do “parasita”. Por outro lado, ocorre “colonização” quando um microrganismo se consegue fixar num hospedeiro e estabelecer um local de reprodução sem que tal resulte, obrigatoriamente, em invasão ou lesão dos tecidos (Willey et al., 2008). Na visão da medicina ou da patologia, porém, uma infecção é mais do que um organismo que se multiplica num hospedeiro: é a resposta do organismo à presença desses microrganismos, ditos patogénicos, que crescem e se multiplicam e, eventualmente, invadem os tecidos do hospedeiro. Ao observar uma citologia cutânea de um doente com lesões cutâneas, um dos principais objetivos é determinar se há ou não infecção cutânea e isto faz-se, de facto, através da procura simultânea por microrganismos patogénicos e por uma resposta celular (Gortel, 2013). Esta resposta, por sua vez, integra parte do processo inflamatório que se instaura como reação à presença e multiplicação destes microrganismos, quer provoquem ou não danos diretos no tecido cutâneo (Slauson & Cooper, 2002).

1.1. PREVALÊNCIA

1.1.1. Prevalência global das doenças dermatológicas

As doenças dermatológicas constituem uma fatia generosa da casuística da clínica de pequenos animais, segundo alguns estudos 20% a 75% (Gasparetto et al., 2013; Khoshnegah, Movassaghi & Rad, 2013; Scott & Paradis, 1990), embora a origem do extremo superior desse intervalo seja algo obscura. Ademais, a pele é o órgão mais comumente indicado nos estímulos iatrotópicos e motivos secundários de consulta e por classificação sindrómica reflete cerca de 32% a 36% das afeções (Nielsen, Dean, Robinson, Massey & Brennan, 2014; O'Neill, Church, McGreevy, Thomson & Brodbelt, 2014; Robinson, 2014; Robinson, Dean, Cobb & Brennan, 2015).

1.1.2. Prevalência das infeções cutâneas

Não há estimativas precisas sobre a prevalência de algo como “infeções cutâneas”, pois o termo inclui uma miríade de infeções e a forma como as doenças dermatológicas são classificadas e

agrupadas nos diversos estudos é muito variável. As piodermites são consideradas por certos autores as doenças de pele mais frequentemente diagnosticadas no cão (Gasparetto et al., 2013; Hill et al., 2006; Khoshnegah et al., 2013; Miller, Griffin & Campbell, 2013; Noli, 2015). No estudo de Khoshnegah et al. (2013), por exemplo, a foliculite bacteriana superficial refletiu 18% dos diagnósticos, sendo o diagnóstico dermatológico e o tipo de piodermite mais comum, com uma prevalência de 4,4% na população global de cães. Os restantes tipos de piodermites são bastante menos prevalentes (Gasparetto et al., 2013; Hill et al., 2006; Khoshnegah et al., 2013; Miller et al., 2013). A prevalência global da dermatite por *Malassezia* aparenta variar entre 0,4% e 0,54% (Gasparetto et al., 2013; Hill et al., 2006; Khoshnegah et al., 2013), mas é provavelmente uma subestimação da prevalência real dada a parca utilização de citologia.

Há que fazer ainda um apontamento particular quanto às doenças alérgicas, porque as infeções cutâneas são bastante frequentes nestes doentes (Bizikova et al., 2015; Colombo, Hill, Shaw & Thoday, 2007; Lloyd, 2009; Loeffler, 2014; Loeffler, Soares-Magalhães, Bond & Lloyd, 2006; Lund, 2008; Miller et al., 2013; Vieira, 2008). Nos cães com dermatite atópica, a prevalência das infeções cutâneas varia amplamente: entre 4,9% e 74,1% quanto às infeções bacterianas e 1,4% e 66,6% quanto àquelas por *Malassezia* (Colombo et al., 2007; Favrot, Steffan, Seewald & Picco, 2010; Lund, 2008; Picco et al., 2008; Saridomichelakisa, Koutinasa, Gioulekasb & Leontidis, 1999; Tarpataki, Pápa, Reiczigel, Vajdovich & Vörös, 2006; Wilhem, Kovalik & Favrot, 2011; Zur, Ihrke, White & Kass, 2002). Loeffler et al. (2006) observaram uma prevalência similar nos cães com reações adversas ao alimento (RAA) e naqueles sem RAA, respetivamente, 32% e 40% no que respeita às piodermites e 24% e 28,2% quanto à dermatite por *Malassezia*. A prevalência das infeções cutâneas em cães com dermatite alérgica à picada da pulga (DAPP) não está tão bem estudada, mas numa revisão de 330 casos de DAPP, por Nesbitt e Schmitz, em 1978, a prevalência de piodermite foi de 10% (citado por Loeffler, 2014).

1.2. BREVES NOÇÕES ANATÓMICAS DA PELE

A pele é composta por uma camada mais externa de tecido epitelial e uma camada mais interna de tecido conjuntivo denominadas, respetivamente, epiderme e derme (Lloyd & Patel, 2003; Miller et al., 2013). Nesta última encontram-se as estruturas anexas da pele, designadamente os folículos pilosos, as glândulas sebáceas e as glândulas sudoríparas epitriquiaias e atriquiaias, os músculos eretores do pelo, vasos sanguíneos e linfáticos e nervos (Miller et al., 2013; Souza et al., 2009). A hipoderme, *subcutis* ou tecido subcutâneo corresponde a tecido conjuntivo laxo e adiposo sobre o qual a derme assenta e não faz realmente parte da pele, embora seja geralmente mencionada a seu respeito (Budras et al., 2007; Junqueira & Carneiro, 2013).

A epiderme é geralmente subdivida em cinco estratos, do mais profundo para o mais superficial, os estratos basal, espinhoso, granuloso, lúcido e córneo (Junqueira & Carneiro, 2013; Miller et al., 2013). Embora cada estrato tenha as suas especificidades, há uma transição gradual, uma continuidade, que se traduz no processo de diferenciação dos queratinócitos, que migram constantemente do estrato basal ao córneo enquanto esse processo – a queratinização – ocorre (Miller et al., 2013; Souza, Figuera, Kommers & Barros, 2009). O estrato córneo é formado pelos queratinócitos que atingiram o final deste processo, os corneócitos, numa matriz extracelular de lípidos, sobretudo composta por ceramidas, ácidos gordos de cadeia longa e colesterol (Miller et al., 2013; Nishifuji & Yoon, 2013). As ceramidas são a componente lipídica principal para a plasticidade deste estrato e manutenção da função de permeabilidade da barreira cutânea (Miller et al., 2013; Nishifuji & Yoon, 2013).

1.3. UMA BARREIRA INATA

A pele é uma das primeiras linhas de defesa do organismo e possui uma série de propriedades que a tornam uma barreira física, química e biológica dificilmente ultrapassável (Tizard, 2013). As funções de barreira da pele são sobretudo exercidas pelo estrato córneo, mediadas ou pelos corneócitos ou pela matriz extracelular (Elias, 2007; Miller et al., 2013). A ação de barreira física deriva essencialmente da estrutura muito compacta desse estrato, da descamação contínua (Borkowski & Gallo, 2011; Elias, 2007; Miller et al., 2013) e da presença de pelos, que por si só minimiza o contacto direto dos microrganismos com a pele (Miller et al., 2013). A sua ação de barreira química resulta, em larga medida, de substâncias presentes na matriz extracelular, por exemplo cloreto de sódio, transferrina e lípidos (Miller et al., 2013), em especial ácidos gordos livres e esfingosina, que manifestam uma potente ação antimicrobiana contra bactérias, e leveduras (Elias, 2007). Da imunidade inata fazem também parte os péptidos antimicrobianos, pequenas moléculas catiónicas expressas pelos queratinócitos e por leucócitos fagocitários, que exibem largo espectro de ação contra bactérias, fungos e vírus e promovem a quimiotaxia e a cicatrização de feridas (Borkowski & Gallo, 2011; Leonard, Affolter & Bevins, 2012; Miller et al., 2013). A microbiota cutânea constitui a vertente de barreira biológica da pele, contribuindo para a sua defesa através da competição, com microrganismos potencialmente patogénicos, por nutrientes e nichos e da secreção de substâncias que matam ou inibem esses microrganismos (Borkowski & Gallo, 2011; Elias, 2007; Miller et al., 2013; Tizard, 2013). Todas estas defesas inatas são combinadas com uma série de mecanismos do sistema imunitário inato do organismo, nomeadamente a < o sistema complemento e de células fagocitárias, que tornam a pele ainda mais resistente à invasão por microrganismos (Miller et al., 2013; Tizard, 2013).

1.4. MICROBIOTA BACTERIANA

A divisão clássica entre microbiota residente e transitória refere-se àqueles microrganismos que são encontrados na pele no seu estado normal, fisiológico (Miller et al., 2013). Considera-se microbiota residente aquela que é relativamente consistente na sua composição, estável e capaz de se multiplicar e repovoar após quebra populacional – a estes microrganismos está implícito um carácter comensal (Weese, 2013). Por oposição, a microbiota transitória é, como o nome faz transparecer, temporária, composta por microrganismos oriundos do ambiente ou outras fontes externas, que persistem por poucas horas ou dias (Weese, 2013) e são incapazes de se reproduzir na pele sadia (Miller et al., 2013) – consideram-se contaminantes (Saijonmaa-Koulumies & Lloyd, 1996). Esta microbiota está, pois, em constante mudança. O facto de um microrganismo pertencer à microbiota residente ou à transitória não determina uma virulência menor ou maior, porque qualquer uma pode incluir microrganismos inócuos ou potencialmente patogénicos. Nas circunstâncias certas, esse potencial pode concretizar-se em doença (Weese, 2013). Durante muito tempo, o estudo da microbiota cutânea foi efetuado unicamente com métodos de cultura, que levam a uma subestimação da diversidade e abundância e a uma sobrestimação de certas espécies ou grupos (Kil & Swanson, 2011; Weese, 2013); mostram, por exemplo, uma suposta predominância de bactérias Gram-positivas (Harvey & Lloyd, 1995). Atualmente, o estudo da microbiota envolve a sequenciação de genes que codificam o rRNA 16S (Hoffmann et al., 2014; Sturgeon, Costa & Weese, 2012), que possui regiões conservadas, i.e. que não se alteraram significativamente com a evolução e que estão presentes em quase todas as bactérias (Janda & Abbott, 2007) e outras altamente variáveis entre géneros e, em menor grau, entre certas espécies (Chakravorty, Helb, Burday, Connell & Alland, 2007; Kil & Swanson, 2011). No estudo de Hoffmann et al. (2014), num total de 17 filos identificados, o filo Proteobacteria, constituído por bactérias Gram-negativas (Willey et al., 2008), foi o mais abundante, seguido globalmente pelos filos Firmicutes, Actinobacteria, Bacteroidetes e Cyanobacteria. O género *Ralstonia* foi aquele mais frequentemente isolado da grande maioria das amostras de cães sadios (Hoffmann et al., 2014). Todos os microrganismos tidos por residentes pelos métodos de cultura (Garbacz, Żarnowska, Piechowicz & Haras, 2013b; Harvey & Lloyd, 1994; Harvey & Lloyd, 1995; Kloos, Zimmerman & Smith, 1976; Krogh & Kristensen, 1976; Miller et al., 2013; Nagase et al., 2002; Saijonmaa-Koulumies & Lloyd, 1996; Stepanović et al., 2001) foram identificados em pelo menos 50% dos cães, mas representaram uma ínfima parte dos microrganismos identificados. Os autores verificaram uma grande variabilidade na composição da microbiota individualmente e entre regiões corporais do mesmo indivíduo, mais rica nas zonas de maior densidade pilosa (Hoffmann et al., 2014). Noutro estudo de carácter mais preliminar, o filo Firmicutes foi o mais comum, predominando os géneros *Staphylococcus* e *Lactobacillus* (Sturgeon et al., 2012).

1.5. MICROBIOTA FÚNGICA – O CASO PARTICULAR DO GÉNERO *MALASSEZIA*

As leveduras do género *Malassezia* – filo Basidiomycota, sub-filo Ustilaginomycotina (Wang, Theelen, Groenewald, Bail & Boekhout, 2014) – estão entre os muitos fungos saprófitas que podem ser isolados dos pelos e da superfície da pele do cão (Miller et al., 2013). Ainda assim, através de métodos moleculares verificou-se que a sua abundância é relativamente baixa quando comparada com o todo da microbiota fúngica cutânea – ou micobiota (Meason-Smith et al., 2015). Este género inclui, até à data, 14 espécies (Cafarchia et al., 2011), das quais apenas uma não necessita, regra geral, de suplementação lipídica para crescer *in vitro* (Miller et al., 2013): *Malassezia pachydermatis*, outrora *Pityrosporum pachydermatis*, *Pityrosporum canis* (Gordon, 1979; Ribeiro do Prado, Brilhante, Sidrim & Rocha, 2007) ou *Malassezia canis* (Kowalski, 1988; Miller et al., 2013). Esta é a espécie mais comumente observada na pele de cães saudáveis (Brito et al., 2009; Cafarchia et al., 2005; Cafarchia et al., 2011; Nardoni, Mancianti, Corazza & Rum, 2004; Ribeiro do Prado et al., 2008), porém é também um microrganismo patogénico, oportunista (Newbold, Outerbridge, Kass & Maggs, 2014), detetado frequentemente em cães com dermatite seborreica, dermatite atópica e otite externa (Han, Chung, Nam, Park & Hwang, 2013). Não obstante a sua capacidade para crescer sem suplementação lipídica, esta espécie é lipofílica, uma característica transversal ao género (Czyżewska et al., 2016). Das 13 espécies estritamente lipodependentes, as espécies *Malassezia furfur* e *Malassezia sympodialis* têm sido as mais isoladas, muito embora sobretudo em cães com doença dermatológica (Cafarchia et al., 2011; Nardoni et al., 2004; Raabe, Mayser & Weiss, 1998; Sihelská, Váczi & Conková, 2016). Regra geral, a prevalência das leveduras *Malassezia* é maior em cães com lesões cutâneas que com a pele perfeitamente saudável (Cafarchia et al., 2005; Han et al., 2013) e parece variar bastante entre raças – por exemplo, na raça Basset Hound, mesmo em indivíduos saudáveis, sem lesões cutâneas, existem grandes populações (Bond & Lloyd, 1997). De todas as regiões corporais avaliadas, as que mais se destacam são a perilabial e interdigital e os ouvidos/ducto auricular (Bond et al., 1995; Cafarchia et al., 2005; Nardoni, Dini, Taccini & Mancianti, 2007).

1.6. DIAGNÓSTICO CITOLÓGICO DE INFECÇÃO

Embora a anamnese e o exame físico sejam importantes é o exame citológico que permite, de facto, confirmar o diagnóstico de infeção (Glos, 2015; Gortel, 2013) e, quando combinado com o exame físico, pode ser também utilizado na monitorização da resposta ao tratamento (Glos, 2015; Miller et al., 2013; Udenberg et al., 2014). Segundo Glos (2015), “todos os doentes com escamas, pústulas, crostas, alopecia ou mau cheiro” deveriam ser submetidos a este exame. Há dois grandes pontos a averiguar quando se pretende avaliar se há infeção: os microrganismos e as células inflamatórias. A presença esporádica de algumas bactérias ou leveduras na superfície

dos corneócitos é normal (Miller et al., 2013) e há indicações orientativas nesse sentido, embora algo díspares para as leveduras (Udenberg et al., 2014) (Tabela 1). É, no entanto, crucial ter em conta as lesões observadas, porque independentemente de números orientativos a citologia deve ser sempre interpretada à luz do exame físico (Gortel, 2013).

Tabela 1 - Valores considerados normais para as bactérias e tendencialmente razoáveis para as leveduras *Malassezia* na avaliação citológica quantitativa de amostras cutâneas em cães.

Microrganismo	N.º de células/campo	Referência
Bactérias - cocos	<2 ⁽¹⁾	Colombo, 1997 (citado por Udenberg et al., 2014)
Bactérias - bastonetes	<2 ⁽¹⁾	Colombo, 1997 (citado por Udenberg et al., 2014)
Leveduras <i>Malassezia</i>	≤1-2 ⁽²⁾	Miller et al., 2013
	<1 ⁽³⁾	Bond, Collin & Lloyd, 1994; Machado et al., 2011

⁽¹⁾ N.º médio de bactérias extracelulares por campo de imersão em óleo (ampliação de 1000x).

⁽²⁾ N.º de leveduras por campo (ampliação de 400x).

⁽³⁾ N.º de leveduras por campo de imersão em óleo (ampliação de 1000x) com a técnica da fita adesiva.

Apesar de a presença de bactérias numa amostra de uma lesão típica ser sugestiva de infeção bacteriana, a infeção só se confirma perante uma resposta inflamatória associada, i.e. quando se observam bactérias fagocitadas por leucócitos (Hillier et al., 2014). A evidência de bactérias intracelulares é o critério que distingue uma “verdadeira” piodermite de um sobrecrecimento bacteriano (Miller et al., 2013), embora a resposta inflamatória possa estar ausente em situações particulares (Hillier et al., 2014). Os bastonetes são mais comuns em piodermites de superfície e profundas e o seu papel deve ser ponderado, porque se, por um lado, a observação de bactérias fagocitadas de uma pústula intacta sugere um papel ativo na infeção, por outro a observação de populações mistas, de cocos, bastonetes e, até, leveduras, sobretudo em lesões que não estão intactas, pode indicar contaminação (Gortel, 2013). Nas recomendações para o diagnóstico e tratamento da foliculite bacteriana superficial, do Grupo de Trabalho dedicado à elaboração de Diretrizes para o uso de Antimicrobianos, da Sociedade Internacional para as Doenças Infecciosas dos Animais de Companhia (*Antimicrobial Guidelines Working Group of the International Society for Companion Animal Infectious Diseases – ISCAID*), a citologia é fortemente aconselhada para um correto diagnóstico, mas o Grupo admite o seu uso opcional, estabelecendo obrigatoriedade: quando não se veem lesões típicas, sobretudo pústulas, mas a suspeita se mantém; quando, na presença de lesões típicas, se opta por terapêutica empírica e a resposta é fraca; ou antes de se realizar cultura bacteriana, pois as observações da citologia influenciam a sua interpretação (Hillier et al., 2014). Os autores indicam ainda o papel essencial da citologia para a deteção de infeção por *Malassezia*, frequentemente concomitante a foliculite bacteriana superficial e que de outra forma passará despercebida (Hillier et al., 2014).

1.7. PIODERMITES

O termo “piodermite” traduz, literalmente, qualquer dermatite na qual há formação de pús, mais corretamente, exsudados neutrofílicos, seja de caráter estéril ou infeccioso (Neuber & Horvath, 2006; Wael & Husein, 2011). Porém, as doenças pustulares estéreis são algo incomuns (Miller et al., 2013) e, apesar de certas infecções fúngicas poderem resultar na formação de pús (Lloyd, 2009), o termo tornou-se praticamente sinónimo de infecção cutânea bacteriana (Wael & Husein, 2011), englobando várias síndromes clínicas que têm por base a infecção da pele por bactérias piogénicas (Ihrke, 2006; Neuber & Horvath, 2006).

1.7.1. Agentes etiológicos

Na origem da maioria das piodermites estão estafilococos coagulase-positivos (Nuttall, Harvey & McKeever, 2009), sobretudo – cerca de ou mais de 90% dos casos (Lloyd, 2009; Noli, 2003) – a espécie *S. pseudintermedius* (Gortel, 2013), reconhecida num passado recente e cujo nome trai a sua história: *Staphylococcus* [pseudo-] *intermedius*, i.e., falso *Staphylococcus intermedius* (Devriese et al., 2005). A espécie *S. intermedius* foi, durante várias décadas, identificada como o principal agente patogénico implicado nas piodermites em cães (Bannoehr & Guardabassi, 2012; Fitzgerald, 2009), mas a diversidade de isolados de vários animais constituía um prelúdio para o que se veio a verificar: que, na verdade, essa diversidade traduzia três espécies distintas, designadamente *S. intermedius*, *S. pseudintermedius* e *Staphylococcus delphini*, que pelas suas relações genéticas próximas são agora incluídas no Grupo de *Staphylococcus intermedius* (GSI; *S. intermedius* group, SIG) (Bannoehr & Guardabassi, 2012; Ben Zakour, Beatson, van den Broek, Thoday & Fitzgerald, 2012; Sasaki et al., 2007). O segundo agente patogénico mais importante parece ser o *Staphylococcus schleiferi* (Ihrke, 2009; Kawakami et al., 2010; Morris, 2013c; Ravens, Vogelnest, Ewen, Bosward & Norris, 2014). Muito esporadicamente surgem outros estafilococos e géneros de bactérias – algumas mais típicas de infecções profundas e umas mais raras que outras. Porém, há que ter em conta que o isolamento de uma espécie a partir de lesões cutâneas pode só indicar colonização (Eckholm, Outerbridge, White & Sykes, 2013) ou mesmo contaminação (Borio et al., 2015) e que várias espécies podem estar envolvidas e, por vezes, só se isola uma delas (Eckholm et al., 2013).

1.7.2. Fisiopatologia da infeção por estafilococos

O conhecimento sobre a fisiopatologia destas infeções é, ainda, limitado (Garbacz, Żarnowska, Piechowicz & Haras, 2013a). No entanto, sabe-se que a infeção não surge prontamente em cães saudáveis, com a pele normal e, portanto, deve ser encarada como um sinal de alguma alteração subjacente que precisa de ser corrigida (Miller et al., 2013). Sabe-se que as bactérias tendem a

proliferar com um aumento concomitante de temperatura e humidade (Saijonmaa-Koulumies & Lloyd, 1996) e que a espécie *S. pseudintermedius* produz múltiplos fatores de virulência (Garbacz et al., 2013a) – assumindo especial relevância a capacidade de produção de biofilmes e de toxinas esfoliativas – que, em certa medida, contribuem para a fisiopatologia da infeção, todavia há mais fatores envolvidos, particularmente relacionados com alterações específicas cutâneas – como inflamação, obstrução ou degeneração folicular – metabólicas e/ou imunitárias (Miller et al., 2013). O prurido associado a muitas das doenças dermatológicas pode também contribuir para o aumento da inflamação, permeabilidade e humidade da pele.

1.7.2.1. Relação com as leveduras *Malassezia*

As opiniões sobre esta relação são contraditórias. Alguns autores associam a prévia utilização de antibióticos à dermatite por *Malassezia*, o que poderia suceder devido a um desequilíbrio da microbiota com consequente favorecimento competitivo das leveduras (Bond et al., 1996). Por outro lado, há quem presuma uma relação simbiótica entre os estafilococos e as leveduras na pele (Miller et al., 2013; Nuttall, 2003), pois não só a presença de *S. pseudintermedius* na pele de cães com elevados números de *Malassezia* é frequente, como também o são as piодermite. Para Miller et al. (2013), a presença de grandes populações de estafilococos comensais é mesmo um fator predisponente a dermatite por *Malassezia*.

1.7.3. Classificação

Existe uma classificação genérica e praticamente universal das piодermite que se baseia na profundidade da infeção na pele (Lloyd, 2009) e é útil sob várias perspetivas, pois facilita o diagnóstico e dá informação quanto à probabilidade da existência de uma doença subjacente, quanto a especificidades do tratamento e quanto ao prognóstico (Ihrke, 2006). Esta classificação preconiza três grupos distintos de piодermite (Cordero, 2015; Ihrke, 2009; Lloyd, 2009; Miller et al., 2013; Noli, 2003) ou três níveis de infeção (Schmidt, 2015). O primeiro nível corresponde às piодermite de superfície, em que apenas a superfície do estrato córneo está envolvida (Noli, 2003); há já quem não trate este tipo de dermatites por piодermite, pois observa-se apenas um sobrecrecimento bacteriano (Schmidt, 2015), mas para a maioria dos autores estas entidades clínicas mantêm ainda o atributo de “piодermite” (Cordero, 2015; Ihrke, 2009; Lloyd, 2009; Miller et al., 2013; Noli, 2003). Neste grupo incluem-se a dermatite piotraumática, também designada dermatite húmida aguda ou *hot spot*, o intertrigo, conhecido por dermatite das pregas de pele (Ihrke, 2009; Lloyd, 2009; Miller et al., 2013; Noli, 2003) e, para alguns, a síndrome de sobrecrecimento bacteriano (Schmidt, 2015). O segundo nível diz respeito às piодermite superficiais, nas quais a infeção se alastra para lá da superfície a outras camadas da epiderme

e/ou ao epitélio folicular (Miller et al., 2013; Schmidt, 2015) e inclui, segundo Miller et al. (2013), o impetigo, a piodermite mucocutânea, a foliculite bacteriana superficial – foliculite bacteriana, foliculite superficial ou, simplesmente, foliculite – e a dermatofilose. Apesar de alguns autores separarem a piodermite esfoliativa ou piodermite superficial disseminada da foliculite (Ihrke, 2009; Lloyd, 2009; Noli, 2003; Nuttall et al., 2009), esta é referida por Miller et al. (2013), ainda que não expressamente, nas possíveis apresentações da foliculite. O último nível corresponde às piodermites profundas, quando a infeção se instala profundamente nos folículos e na derme, podendo haver envolvimento dos tecidos subcutâneos. Estas piodermites são mais raras, graves e exigentes no que respeita ao diagnóstico e à terapêutica (Ihrke, 2006; Lloyd, 2009; Miller et al., 2013; Noli, 2003; Nuttall et al., 2009; Schmidt, 2015).

1.7.3.1. Piodermites de superfície

A dermatite húmida aguda corresponde a um processo inflamatório da pele numa zona que é previamente traumatizada pelo próprio doente – ao coçar ou morder – na tentativa de aliviar algum desconforto, prurido ou dor e na qual se verifica erosão moderada ou, mesmo, ulceração. Estas lesões têm um carácter agudo e assumem um aspeto típico que lhes dá a dita designação de *hot spots*: são húmidas, alopecicas, com uma zona central exsudativa e um halo eritematoso exterior e, geralmente, possuem margens bem definidas. As suas causas são tão variadas quanto aquelas que podem originar prurido, dor ou desconforto: as mais comuns incluem infestações parasitárias, doenças alérgicas, otite externa, doenças dos sacos anais, mau estado da pelagem e corpos estranhos, contacto com substâncias irritantes, doenças musculoesqueléticas e doenças comportamentais. O tratamento deve ser logo iniciado, porque estas lesões podem evoluir para foliculite superficial/profunda e/ou furunculose (Cobb, Edwards, Jagger, Marshall & Bowker, 2005; Holm, Rest & Seewald, 2004; Miller et al., 2013).

O intertrigo corresponde a uma dermatite por fricção de pele contra pele, logo está intimamente relacionado com as zonas de pregas de pele (Miller et al., 2013), onde há uma fraca ventilação, que associada à constante fricção e possível maceração dos tecidos promove o sobrecrecimento de bactérias e leveduras (Lloyd, 2009; Miller et al., 2013); a pele está húmida e eritematosa e, por vezes, apresenta um exsudado esbranquiçado a amarelado (Lloyd, 2009). As várias formas de intertrigo prendem-se com a localização das pregas, por isso surgem tipicamente associadas a certas raças, sobretudo molossóides e braquicefálicas, sendo o Buldogue Inglês o exemplo típico de todas as formas de intertrigo (Miller et al., 2013; Nuttall et al., 2009).

A síndrome de sobrecrecimento bacteriano foi descrita num passado não muito distante (Pin, Carlotti, Jasmin, DeBoer & Prélaud, 2006) e implica não só a observação de um grande n.º de bactérias extracelulares, que comprove o sobrecrecimento na superfície da pele, como de sinais

clínicos compatíveis, sem pápulas, pústulas, colaretes epidérmicos e crostas. Apesar de estar sobretudo relacionada com um sobrecrecimento de estafilococos, pontual e simultaneamente podem observar-se leveduras ou outras bactérias. Os doentes manifestam sempre algum prurido e muitos exalam mau cheiro. As lesões tendem a ser localizadas, mas há um sobrecrecimento bacteriano mesmo em pele aparentemente normal, portanto presume-se que a síndrome tenha, na verdade, um caráter generalizado (Carlotti, 2006; Pin et al., 2006; Viaud et al., 2012).

1.7.3.2. Piodermites superficiais

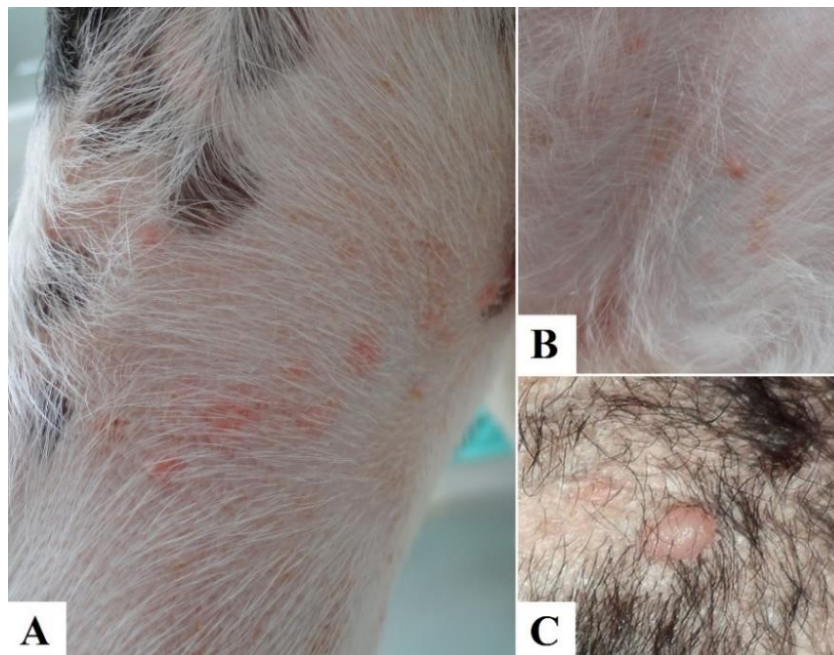
O impetigo é uma dermatite pustular caracterizada por pústulas não foliculares, subcórneas, que afeta sobretudo as áreas glabras da pele (Miller et al., 2013). Esta doença é típica de cachorros e cães na puberdade e surge, muitas vezes, sem causa aparente, embora possa ser secundária a parasitismo, infeções virais, más condições ambientais e/ou má nutrição. No impetigo bolhoso observam-se pústulas muito grandes. Esta forma de impetigo é mais característica de cães mais velhos cujo sistema imunitário está deprimido, por exemplo por doença sistémica e debilitante, sobretudo doenças endócrinas, ou por quimioterapia (Miller et al., 2013; Nuttall et al., 2009).

A piodermite mucocutânea é um tipo de piodermite que afeta as junções mucocutâneas e a sua etiologia é desconhecida. Não é muito comum e pode ocorrer em qualquer cão, porém o Cão de Pastor Alemão e cruzados da raça parecem predispostos. A pele dos lábios e a região perioral são as zonas normalmente afetadas, especialmente nas comissuras, podendo haver edema, eritema, crostas, erosão e/ou ulceração, fissuras e despigmentação (Bassett, Burton & Robson, 2004; Hnilica, 2011; Miller et al., 2013; Nuttall et al., 2009). As lesões noutras zonas – plano nasal, narinas, pálpebras, vulva, prepúcio e ânus – são semelhantes (Bassett et al., 2004; Miller et al., 2013); nas narinas, as lesões são frequentemente unilaterais (Nuttall et al., 2009).

Na foliculite bacteriana superficial ocorre infeção da porção mais superficial dos folículos. Os doentes podem ou não apresentar prurido e a sua intensidade é muito variável e está, em parte, relacionada com a causa da infeção. Nesta doença não há uma distribuição lesional distintiva, nem tão pouco uma única apresentação clínica: há, sim, lesões típicas (Miller et al., 2013). Essas lesões são pápulas eritematosas e pústulas (Hillier et al., 2014). Uma vez que a infeção invade o folículo piloso, pode por vezes ser visível uma haste pilosa na zona central das lesões (Figura 1). Entre as lesões muito comuns incluem-se escamas, crostas, colaretes epidérmicos, eritema, alopecia, escoriações e hipo ou hiperpigmentação (Hillier et al., 2014; Miller et al., 2013). Nos cães de pelo curto, o único sinal visível pode ser a característica aparência de “roído por traças” (Figura 2), que resulta da elevação de tufo de pelo nas zonas infetadas, que caem e originam pequenas zonas de alopecia, distintas do resto da pelagem e que tendem a aumentar de tamanho à medida que a infeção progride. Nos cães com pelo longo, a infeção pode passar ainda mais

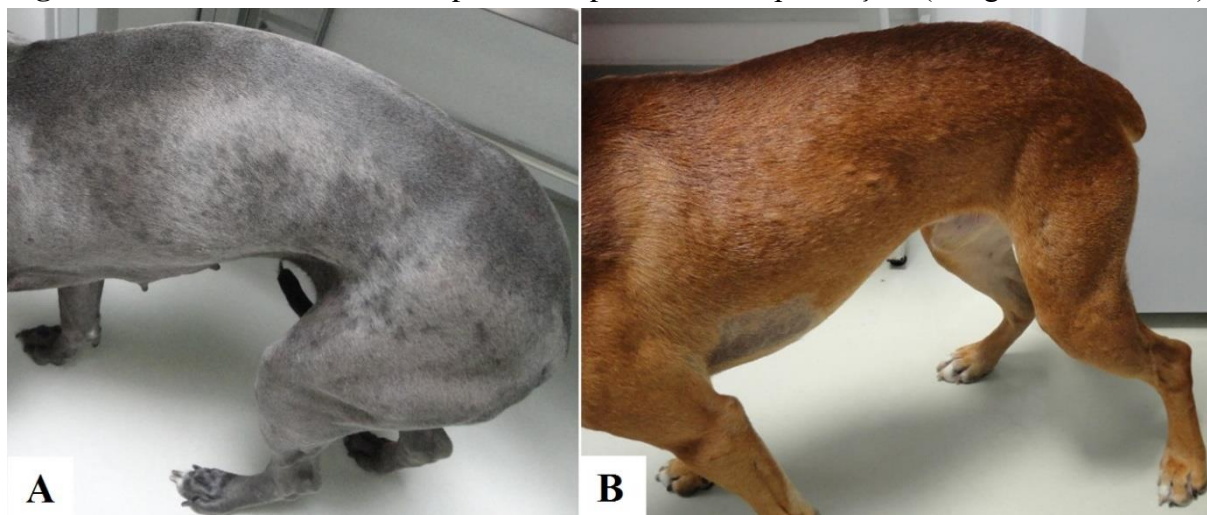
despercebida, dada a subtileza dos sinais clínicos: perda de brilho da pelagem, maior queda de pelo que o habitual e, mais tarde, descamação visível. A foliculite superficial pode progredir para foliculite profunda, furunculose e/ou celulite (Miller et al., 2013; Schmidt, 2015).

Figura 1 – Lesões de foliculite bacteriana superficial (fotografias da autora).



A – pápulas eritematosas; B – pústula e pequenas pápulas; C – pústula com hastes pilosas centrais.

Figura 2 – Foliculite bacteriana superficial – padrão “roído por traças” (fotografias da autora).

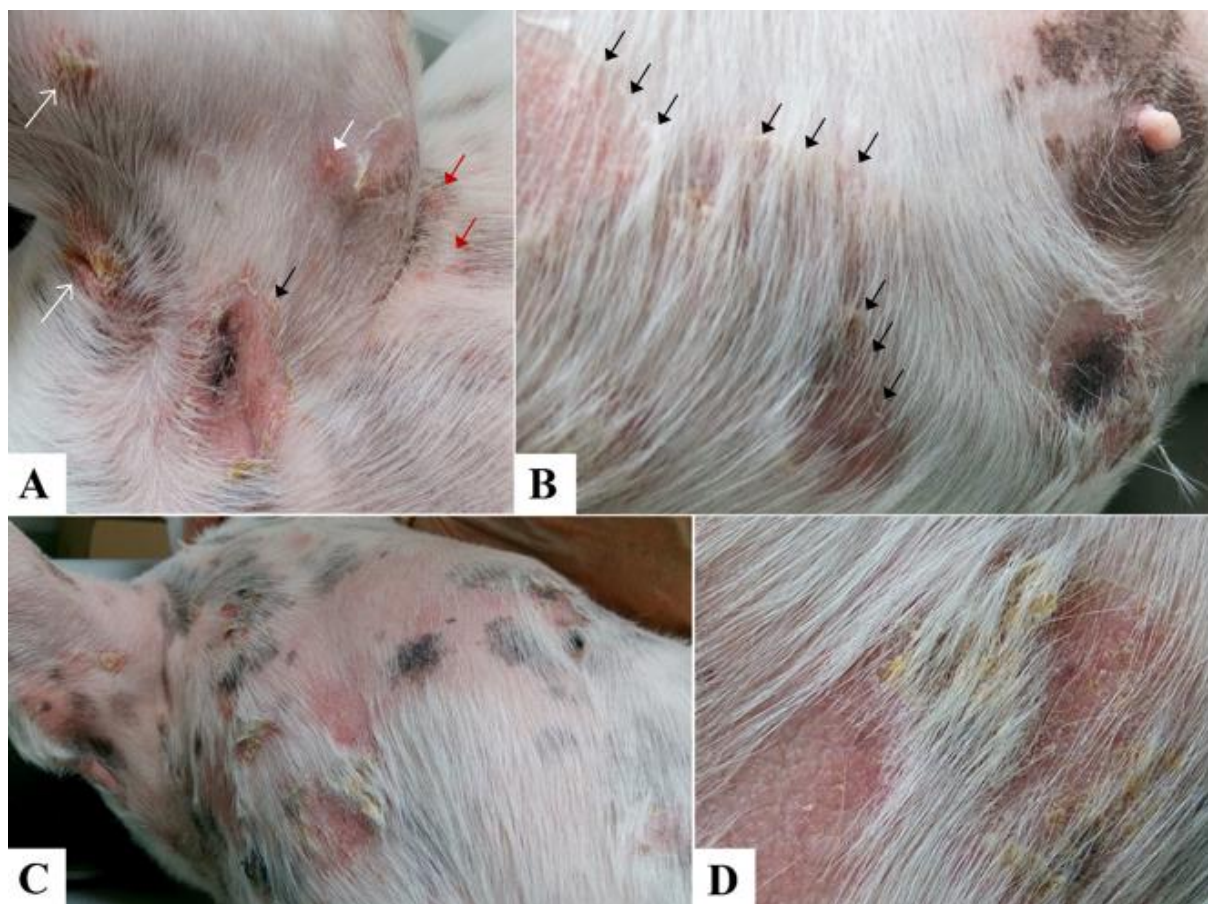


A – cadela da raça Dogue Alemão com suspeita de hipersensibilidade alimentar; B – cão da raça Boxer com dermatite atópica.

A piodermite superficial disseminada ou piodermite superficial esfoliativa é, segundo Lloyd (2009) e Gortel (2013) uma síndrome que se observa, por vezes, em conjunto com lesões mais típicas de foliculite. É mais comum nas regiões glabras e de fricção (Lloyd, 2009) (Figura 3). Miller et al. (2013) referem-na como uma forma particular de foliculite, característica do Cão de Pastor das Shetland e outras raças do tipo *collie*. As lesões mais típicas são largas escamas

que se afastam centrifugamente e criam grandes colaretes que podem por sua vez coalescer e produzir extensas áreas de alopecia (Gortel, 2013). Estas lesões podem surgir quase simétricas no tronco, similarmente à alopecia bilateral, simétrica, de origem endócrina (Miller et al., 2013).

Figura 3 – Piodermite superficial esfoliativa numa cadela da raça Buldogue Francês – região axilar (fotografias da autora).

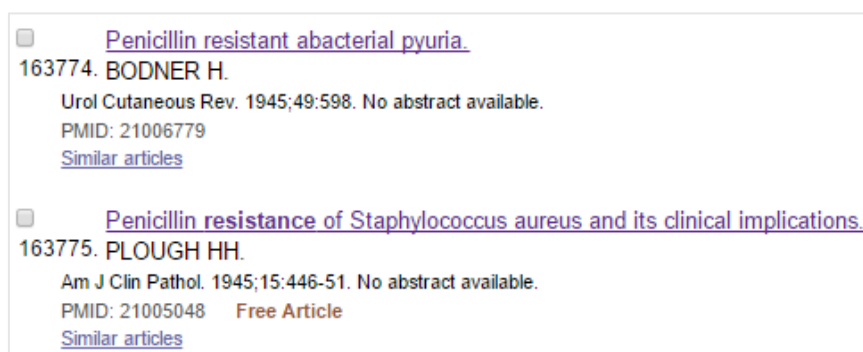


A – pústula intacta (seta branca, fechada), pápulas (setas vermelhas), grande colarete eritematoso (seta preta), crostas (setas brancas, abertas); B – colaretes coalescentes (setas); C – grandes áreas de eritema, alopecia e lesões crostosas; D – pormenor de C, crostas aderentes ao pelo.

1.7.4. O problema das resistências

O assunto das resistências aos antimicrobianos não é novo. De facto, já em 1945 – pouco depois da descoberta da penicilina em 1928 e do início da sua produção em larga escala em 1943 (Pereira & Pita, 2005) – surgiam referências a bactérias resistentes à penicilina, como revela a pesquisa dos termos *antimicrobial resistance* e *antibiotic resistance* na PubMed®, em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed> (Figura 4). Contudo, esse problema tem vindo a agravar-se e chegou a um nível alarmante, havendo uma preocupação particular quanto aos antibióticos, evidente no Relatório Global sobre a Vigilância da Resistência aos Antimicrobianos, elaborado em 2014 pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (OMS, 2014a). Só na Europa, cerca de 400000 pessoas por ano são infetadas com bactérias resistentes e cerca de 25000 morrem (Gabinete Regional para a Europa da OMS, 2012).

Figura 4 – Resultados mais antigos da pesquisa na PubMed® por *antimicrobial/antibiotic resistance*.



De acordo com a OMS (2014b), em certos contextos da Região Europeia, 60% das infeções por *S. aureus* correspondem a MRSA e embora esta espécie seja talvez a mais “famosa”, tipicamente associada a feridas e septicemia, há outras igualmente relevantes (OMS, 2014a). Em 2015, na 68.^a Assembleia Mundial da Saúde, foi aprovado um plano de ação global, com cinco objetivos basilares: “melhorar a consciencialização e a compreensão da resistência aos antimicrobianos”; “reforçar a vigilância e a investigação”; “reduzir a incidência das infeções”; “optimizar o uso dos antimicrobianos na saúde humana e animal”; e “garantir o investimento sustentável em intervenções contra a resistência aos antimicrobianos” (OMS, 2015a; OMS, 2015c). Mais, espelho da presente ameaça global, o tema da resistência aos antimicrobianos foi debatido na Assembleia Geral das Nações Unidas (AGNU), em Setembro de 2016, sendo apenas a quarta vez que um tópico relacionado com a saúde é discutido na AGNU depois do vírus da imunodeficiência humana, das doenças crónicas não transmissíveis e do vírus Ébola (OMS, 2016).

A resistência aos antibióticos é um fenómeno que ocorre naturalmente, mas tem sido acelerado com a utilização excessiva e, muitas vezes, incorreta dos antibióticos (OMS, 2015a) e o ritmo de descoberta e desenvolvimento de novos antibióticos não o acompanha. As bactérias podem ser intrinsecamente resistentes ou adquirirem resistência através de diversas vias. Estas incluem não só a transmissão vertical – i.e. para as células-filhas, por replicação – de genes que conferem resistência e que surgiram por mutações espontâneas, mas também a transmissão horizontal, i.e. não relacionada com a reprodução e que pode ocorrer através de três mecanismos principais, designadamente a conjugação – na qual há transferência de plasmídeos por contacto físico direto entre bactérias, inclusive de espécies diferentes – a transformação – na qual o material genético é incorporado a partir do microambiente externo, geralmente acumulado por morte e lise celular de outras bactérias – e a transdução – na qual a transferência de material genético se dá por bacteriófagos (Mayer, 2016; Todar, 2012). Quando os antibióticos de primeira linha são ineficazes, devido à existência de bactérias resistentes, é necessário usar outros antibióticos,

normalmente mais dispendiosos (OMS, 2015d). Contudo, hoje em dia, há, mesmo assim, certas infeções impossíveis de debelar devido à resistência de certas estirpes a virtualmente todos os antibióticos disponíveis, inclusive os de última linha. De facto, nos doentes infetados por bactérias resistentes o risco de morte é maior (OMS, 2014a) e o tratamento e permanência em ambiente hospitalar tendem a prolongar-se, bem como o risco de transmissão destas bactérias. Muitos dos procedimentos da medicina moderna podem vir a ser gravemente afetados se o problema não for, pelo menos, estagnado, designadamente muitos procedimentos cirúrgicos, para os quais o sucesso da intervenção será menor e o risco associado muitíssimo maior (OMS, 2015b).

No setor veterinário, a situação é igualmente – e de forma crescente – preocupante. Devido à estreita ligação com o Homem através da cadeia alimentar, há uma ênfase particular na utilização de antibióticos na produção animal, que, apesar de essencial para a saúde e bem-estar animal, é um dos fatores na base da elevada resistência aos antimicrobianos (Organização Mundial para a Saúde Animal [OIE], 2015). Por outro lado, na clínica de pequenos animais, há uma consciencialização cada vez maior para este problema, pela saúde e bem-estar dos doentes e pelo potencial zoonótico de bactérias multirresistentes, especialmente se considerada a relação de proximidade entre os animais de companhia e o Homem, assumindo particular relevância a resistência à meticilina nas espécies *S. aureus* e *S. pseudintermedius* (Agência Europeia de Medicamentos, 2015; Rankin, 2015). A OIE e a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO) têm intensificado a sua coloração mútua e com a OMS e estão envolvidas na campanha global e projetos associados à luta contra as resistências (OMS, FAO & OIE, 2016). Em Portugal, em 2013, foi criado o Programa de Prevenção e Controlo de Infeções e de Resistência aos Antimicrobianos (PPCIRA), um dos programas de saúde prioritários do Plano Nacional de Saúde (Direção-Geral da Saúde, 2013) e a Direção-Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV) implementou o Plano de Ação Nacional para a Redução do Uso de Antibióticos nos Animais (PANRUAA), em vigor desde Janeiro de 2014. O PANRUAA inclui várias vertentes de ação, entre as quais dois eixos estratégicos principais, nomeadamente a “proteção da saúde pública”, considerando o princípio de “Uma só Saúde” e a “preservação do arsenal terapêutico” (DGAV, 2013).

Se durante muito tempo imperou a ideia de que a terapêutica tópica seria essencialmente útil como adjuvante à terapêutica sistémica no tratamento das infeções cutâneas no cão, o problema das resistências aos antimicrobianos, em especial, a ocorrência de estirpes de estafilococos multirresistentes, que torna as opções terapêuticas sistémicas cada vez mais limitadas, dá um destaque cada vez maior à abordagem tópica no tratamento dessas infeções (Hillier et al., 2014; Jeffers, 2013; Morris, 2013a; Mueller, Bergvall, Bensignor & Bond, 2012).

1.7.5. Tratamento tópico das piодermites

O tratamento de uma piодermite passa não só pela instituição de terapêutica antimicrobiana, mas também, necessariamente, pela identificação e resolução ou gestão do que possa estar na origem da infeção (Miller et al., 2013). Se a causa não for identificada e, dentro do possível, corrigida, a resposta ao tratamento antimicrobiano será muito provavelmente fraca ou, mesmo, negativa e ocorrerão recidivas pouco tempo após o final do tratamento. Por outro lado, mesmo que a causa seja corrigida, sem um tratamento antimicrobiano adequado a infeção pode persistir e agravar-se (Miller et al., 2013).

1.7.5.1. Considerações gerais

Há ainda uma parca utilização da terapêutica tópica, sob o pretexto de uma maior exigência relativa à *compliance* (Hillier et al., 2014). A *compliance* ou adesão à terapêutica, seja quanto ao cumprimento do plano prescrito ou da persistência em tratamentos prolongados é, de facto, extremamente importante para a resolução da infeção e pode ser melhorada através de uma adequada escolha do plano terapêutico, personalizada, que tenha em conta não só o doente, mas também fatores relativos aos responsáveis pela aplicação do tratamento (Miller et al., 2013). Quando combinada com a terapêutica sistémica, a terapêutica tópica permite uma resolução mais rápida das lesões que a terapêutica sistémica exclusiva (Hillier et al., 2014). No entanto, a terapêutica tópica em regime exclusivo é cada vez mais privilegiada no manejo das piодermites superficiais e se efetuada de forma correta é muitas vezes suficiente para a resolução da infeção (Hillier et al., 2014; Morris, 2013a). A terapêutica sistémica tem o inegável potencial de afetar as populações bacterianas noutras regiões do organismo, muito para lá de afetar unicamente as populações responsáveis pela infeção cutânea, o que pode significar a seleção global, ou seja, sistémica, de estirpes resistentes aos antibióticos utilizados (Hillier et al., 2014). A terapêutica tópica tem a grande vantagem do acesso direto ao órgão-alvo (Miller et al., 2013), pelo que se reduz grandemente a exposição dessas outras populações a fármacos antimicrobianos (Hillier et al., 2014). O facto de o acesso à pele ser direto implica ainda que se consigam atingir maiores concentrações nas lesões cutâneas do que por via sistémica (Hillier et al., 2014). A terapêutica tópica tem ainda a vantagem de permitir a remoção direta dos microrganismos da superfície da pele (Hillier et al., 2014) e de, em algumas situações, ser menos dispendiosa do que a terapêutica sistémica. As suas maiores desvantagens são eventuais odores desagradáveis e permanência de resíduos na pele ou na pelagem, o que varia largamente com a substância ativa e com a formulação e, ainda, a possibilidade de ocorrência de reações adversas localizadas (Miller et al., 2013). Esta última desvantagem deve ser colocada em perspectiva, pois se por um lado se sabe que alguns antimicrobianos de uso tópico podem desencadear pequenas irritações cutâneas

localizadas, por outro a sua utilização reduz a possibilidade de reações adversas sistêmicas, mais debilitantes (Hillier et al., 2014; Miller et al., 2013).

A ação terapêutica que um produto de uso tópico exerce na pele depende não só da substância ativa, mas também do veículo e da forma de aplicação desse produto. Embora a capacidade de penetração da substância ativa na pele – que, no fundo, traduz a sua absorção – seja talvez mais relevante nas piodermites profundas é também importante nas infeções mais superficiais (Miller et al., 2013) e os fatores que afetem essa capacidade vão influenciar a resposta ao tratamento. Estes fatores incluem a concentração, solubilidade e coeficiente de difusão da substância ativa, o pH local, interações com os excipientes ou outros produtos de uso tópico concomitantes, a hidratação da pele, a localização e tipo de lesões e a presença de inflamação. No Homem, o envelhecimento da pele parece também influenciar, de forma negativa, a absorção percutânea destes produtos, mas não há referências sobre esta matéria em cães (Miller et al., 2013).

1.7.5.2. Preparações medicamentosas – quais utilizar?

No tratamento das piodermites há uma panóplia de opções, mas aquelas que são apontadas como as mais eficazes e as mais utilizadas são os champôs, as soluções de lavagem (*rinses*), os cremes e as pomadas. A seleção da preparação mais adequada depende sobretudo da extensão e localização anatómica das lesões e da necessidade de atividade residual (Miller et al., 2013). Os champôs medicamentosos são geralmente considerados e mais indicados nas piodermites superficiais generalizadas (Jeffers, 2013; Miller et al., 2013). Este tipo de preparação contém, geralmente, uma ou duas substâncias ativas e adjuvantes que potenciam a ação das primeiras, que exercem por si só ações que indiretamente contribuem para a resolução da infeção quer através da melhoria da barreira cutânea (por exemplo, emolientes e hidratantes) quer através do tratamento direto de alterações subjacentes (por exemplo, antisseborreicos em piodermites secundárias a defeitos de queratinização) ou que promovem o bem-estar do doente (Miller et al., 2013). A própria ação mecânica exercida e o enxaguamento contribuem para a remoção de terra e outros detritos, crostas, microrganismos, mediadores inflamatórios, alérgenos e toxinas (Curtis, 1998; Kloos, Straubinger, Werckenthin & Mueller, 2013; Miller et al., 2013). A remoção física de detritos da superfície da pele, por si só, favorece o contacto entre o champô e as bactérias (Miller et al., 2013), que pode ser ainda melhorado através da tosquia terapêutica do doente (Jeffers, 2013; Miller et al., 2013). A lavagem com champô é também importante na redução do prurido, embora a curto prazo e quer se utilize ou não um champô medicamentoso (Löflath et al., 2007; Schilling & Mueller, 2012). A eficácia antimicrobiana destes champôs é muito variável e depende não só do tipo e da concentração da substância ativa, mas também da sua formulação específica e de fatores externos ao próprio champô (Kloos et al., 2013; Lloyd

& Lamport, 1999; Miller et al., 2013; Young, Buckley, McEwan & Nuttall, 2012). Os dois fatores externos que parecem exercer maior influência são o tempo de contacto e a frequência de aplicação (Morris, 2013a). O tempo de contacto diz respeito ao período de tempo durante o qual o champô está em contacto com as lesões e recomendam-se 10 a 15 minutos de exposição contabilizados a partir do momento da aplicação até à sua remoção (Miller et al., 2013). Esta recomendação tem por objetivo que as substâncias ativas atuem eficazmente e que haja uma maior hidratação do estrato córneo (Löflath et al., 2007). Os banhos devem ser tão frequentes quanto possível (Jeffers, 2013; Morris, 2013a), o que se prende com o facto de a maioria dos champôs não ter grande atividade residual (Morris, 2013a). Se alguns champôs particulares mostram alguma atividade residual, o que foi demonstrado para certos champôs de clorexidina, a verdade é que não é possível estender as mesmas conclusões a outras formulações diferentes (Kloos et al., 2013); mais, não se sabe se essa atividade residual é clinicamente relevante e pertinente para a escolha de um maior ou menor intervalo entre banhos. Há recomendações no sentido de banhos diários ou, no mínimo, em dias alternados (Morris, 2013a), no entanto pode não ser necessário uma frequência tão grande, devendo a mesma ser adaptada individualmente (Curtis, 1998). Os fatores que determinam o intervalo entre banhos são basicamente a gravidade da infeção, a sua causa – se determinada – e a resposta ao tratamento (Miller et al., 2013).

As soluções de lavagem são, talvez, de utilização mais flexível que os champôs, não só porque podem ser usadas quer em piodermites generalizadas quer em piodermites localizadas (Miller et al., 2013), mas também porque são menos exigentes no que respeita à forma de aplicação. Há pessoas para as quais fazer banhos terapêuticos diários ou em dias alternados não é uma opção (Löflath et al., 2007), seja por questões relacionadas com a sua disponibilidade ou mesmo vontade, seja por questões relacionadas com o temperamento do doente (Schilling & Mueller, 2012). A preparação de uma solução de lavagem requer a mistura de uma solução concentrada de uma determinada substância ativa ou de um pó solúvel com água. Estas soluções podem ser diretamente derramadas nas lesões ou, então, aplicadas com o auxílio de um qualquer material absorvente, embebido – por exemplo, algodão ou compressas – ou através de um pulverizador. Contudo, esta última forma de aplicação não é tão eficaz para a aplicação de antimicrobianos. Uma grande vantagem em relação aos champôs é que as soluções de lavagem não necessitam de ser removidas após aplicação e ao secarem deixam uma camada residual de substância ativa, o que se traduz numa maior atividade residual que qualquer champô (Miller et al., 2013). Quando possível, a solução deve ser aplicada diariamente ou, no mínimo, em dias alternados (Morris, 2013a). A tosquia terapêutica pode e deve ser feita caso se pretenda aplicar a solução de lavagem na pele de cães com pelagem muito densa/comprida. Porém, tendo em conta a baixa

viscosidade das soluções de lavagem, é de esperar que a sua utilização seja adequada mesmo em zonas de pele com alguma pilosidade (Mueller et al., 2012).

Os cremes e as pomadas têm uma utilização bastante mais limitada e são apenas recomendados no tratamento de piodermites muito localizadas, numa reduzida área de pele, em zonas glabras ou de pouca densidade pilosa (Jeffers, 2013; Miller et al., 2013; Mueller et al., 2012). Há outras preparações mais raramente utilizadas, como loções, géis, pós ou pulverizações, cuja eficácia é discutível (Miller et al., 2013).

1.7.5.3. Atuais opções terapêuticas de uso tópico

Existem bastantes opções de escolha quanto aos antimicrobianos disponíveis para utilização tópica no tratamento de piodermites em cães, porém só alguns são, de facto, recomendados (Mueller et al., 2012). Globalmente, os antissépticos são as substâncias antimicrobianas mais utilizadas no tratamento tópico de piodermites (Miller et al., 2013). Estes distinguem-se dos desinfetantes mais pelo seu alvo ou objeto de aplicação do que por outras características: os primeiros são aplicados em tecidos vivos – e para tal adequados – enquanto os segundos são aplicados em superfícies inanimadas e são quase sempre nocivos para os tecidos vivos. Regra geral, os antissépticos matam ou inibem o crescimento dos microrganismos por múltiplos mecanismos de caráter inespecífico, muitos ainda mal compreendidos, enquanto os antibióticos têm geralmente alvos celulares específicos, únicos, e mecanismos de ação conhecidos (Heit & Riviere, 2009).

A clorexidina é o antisséptico para o qual há maior e melhor evidência de eficácia no tratamento tópico de piodermites, generalizadas e localizadas (Mueller et al., 2012). Para Morris (2013a), é o antimicrobiano de uso tópico preferencial. Trata-se de uma substância composta, catiónica e sintética, que pertence ao grupo das biguanidas e pode também exercer ação desinfetante (Heit & Riviere, 2009; Miller et al., 2013). Esta substância é pouco solúvel em água, logo, para ser introduzida em preparações farmacêuticas é sempre utilizada sob a forma de um sal, mais comumente diacetato/acetato, digluconato/gluconato ou dicloridrato/ cloridrato (Karpiński & Szkaradkiewicz, 2015). Embora a ação da clorexidina seja dependente da concentração, a formulação assume uma grande influência na sua eficácia antimicrobiana global *in vitro* e *in vivo*, tanto que, em alguns casos, concentrações menores apresentam melhores resultados que concentrações mais elevadas (Lloyd & Lamport, 1999). Os efeitos da clorexidina são essencialmente bactericidas e o seu efeito bacteriostático só se verifica a concentrações da ordem dos 0,02% a 0,06% (Karpiński & Szkaradkiewicz, 2015). O seu espetro de ação abarca bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, vários fungos e alguns vírus. Todavia, a sua ação bactericida é mais acentuada contra bactérias Gram-positivas e certas estirpes Gram-negativas

são mesmo resistentes, como algumas estirpes de *Proteus*, *P. aeruginosa*, *Serratia* e *Providencia* (Cheung et al., 2012; Karpiński & Szkaradkiewicz, 2015; Miller et al., 2013). O mecanismo de ação exato da clorexidina é ainda pouco compreendido, mas pensa-se que as suas moléculas sejam atraídas por moléculas aniónicas da parede e membrana celular bacterianas – fenómeno de adsorção à superfície das bactérias – e com elas interajam inespecificamente (Cheung et al., 2012; Karpiński & Szkaradkiewicz, 2015). Em concentrações bacteriostáticas, os efeitos da interação com as moléculas da membrana celular traduzem-se em alterações no equilíbrio osmótico da célula, que provocam a perda de iões e de moléculas de baixo peso para o meio extracelular (Karpiński & Szkaradkiewicz, 2015). Numa concentração bactericida, a clorexidina provoca morte celular por lise da membrana celular e libertação, precipitação e/ou coagulação dos seus conteúdos (Karpiński & Szkaradkiewicz, 2015; Mueller et al., 2012). As concentrações aparentemente mais eficazes contra *S. pseudintermedius* são de 2% a 4% (Borio et al., 2015; Miller et al., 2013). A utilização exclusiva de clorexidina no tratamento de piodermites de superfície e piodermites superficiais parece viável, inclusive nas generalizadas (Borio et al., 2015; Morris, 2013a). No caso de piodermites generalizadas, Morris (2013a) recomenda a aplicação diária de uma solução de clorexidina a 2% ou pulverizações de clorexidina a 3%, mas como atrás referido, a pulverização pode não ser a forma de aplicação mais adequada para um pleno efeito antimicrobiano e o próprio autor aconselha a adição de banhos de clorexidina ao protocolo, a cada três a quatro dias (Morris, 2013a). Borio et al. (2015) estudaram um protocolo semelhante, com uma duração de quatro semanas, com banhos duas vezes por semana e, nos restantes dias, pulverizações uma vez por dia, sempre com digluconato de clorexidina a 4%. Este protocolo parece ser tão eficaz na resolução de piodermites superficiais, localizadas ou generalizadas, quanto um protocolo de quatro semanas com amoxicilina e ácido clavulânico de doze em doze horas numa dose de 25 mg/kg (Borio et al., 2015). Uma vez que Morris (2013a) refere a resolução completa de piodermites generalizadas com a aplicação diária de uma solução de lavagem a 2% pode assumir-se idêntica viabilidade do mesmo protocolo em piodermites localizadas. As concentrações de 2% e 4% foram já comparadas no tratamento de piodermites superficiais, ainda que com sais distintos, nomeadamente acetato (2%) e gluconato (4%): usando o mesmo protocolo de dois banhos semanais, houve uma melhoria lesional quase idêntica com ambas as concentrações; na maioria dos casos, porém, uma semana de tratamento foi insuficiente para a resolução total da infeção (Murayama, Nagata, Terada, Shibata & Fukata, 2010b). A cura requer, geralmente, um período de tratamento mínimo de três a quatro semanas, logo o estudo de Murayama et al. (2010b) não é totalmente esclarecedor (Borio et al., 2015).

Parece haver sinergia entre a clorexidina e certos antimicrobianos, nomeadamente o tris-EDTA, a fitosfingosina e alguns imidazóis, em especial o miconazol (Miller et al., 2013). Com efeito, há evidências para a recomendação de preparações de clorexidina e miconazol no tratamento de piodermites com ou sem sobrecrecimento de *Malassezia* (Mueller et al., 2012).

O peróxido de benzoílo é outro antisséptico que pode ser recomendado para o tratamento tópico de algumas piodermites, especialmente quando há envolvimento folicular e é aquele para o qual está demonstrado um maior benefício, à parte a clorexidina (Mueller et al., 2012). O efeito antimicrobiano do peróxido de benzoílo resulta da sua metabolização na pele, que dá origem a ácido benzoico e radicais livres de oxigénio (Loeffler, Cobb & Bond, 2011). Para além da sua ação antimicrobiana, possui uma boa ação antisseborreica, com propriedades queratolíticas e queratoplásticas, podendo ser benéfico em piodermites associadas a defeitos de queratinização (Miller et al., 2013). O seu espectro de ação abrange bactérias Gram-positivas, incluindo *S. pseudintermedius* e Gram-negativas, leveduras e outros fungos (Kligman, Leyden & Stewart, 1977). No entanto, é muito irritante para a pele de alguns cães, que podem apresentar eritema, dor e/ou prurido (Guaguere, 1996; Jeffers, 2013; Morris, 2013a). O risco de reações adversas é tanto maior quanto maior a concentração, motivo pelo qual se utilizam concentrações entre 1% e 3% e se devem evitar aquelas $\geq 5\%$, maioritariamente utilizadas em Medicina Humana (Guaguere, 1996; Miller et al., 2013; Morris, 2013a); as mais comuns em Medicina Veterinária são 2,5% e 3%, fundamentalmente sob a forma de champô (Miller et al., 2013).

Se a clorexidina e o peróxido de benzoílo são os antissépticos que com maior segurança podem ser prescritos, há que ter precaução quanto a outros antimicrobianos de eficácia e/ou segurança duvidosas, como os compostos halogenados – iodopovidona, fluoreto de estanho e hipoclorito de sódio – o lactato de etilo, o triclosan, os ácidos acético, bórico, málico e láctico e o mel de grau clínico (Miller et al., 2013; Mueller et al., 2012).

A iodopovidona é um composto iodóforo e mantém praticamente o mesmo espectro do iodo, que tem ótima ação contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, esporos bacterianos, fungos e vírus (Heit & Riviere, 2009; Miller et al., 2013). Porém, induz frequentemente irritação cutânea e sua eficácia parece ser inferior à da clorexidina e à do peróxido de benzoílo (Miller et al., 2013; Mueller et al., 2012). O fluoreto de estanho é muito usado em produtos de higiene oral e o seu espectro inclui bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Miller et al., 2013; Seltzer, Flynn-Lurie, Marsella & Brennan, 2010). Esta substância revelou-se eficaz e segura no tratamento de piodermites em cavalos, a 0,4% e sob a forma de gel (Marsella & Akucewich, 2007), mas a 0,2% não foi eficaz no tratamento de piodermites em cães (Seltzer et al., 2010) e não pode ser recomendado (Mueller et al., 2012). O hipoclorito de sódio é o composto ativo da lixívia, que se diluída corretamente pode ser utilizada no tratamento de algumas infeções

(Jeffers, 2013). A sua ação antimicrobiana está relacionada com a libertação de ácido hipocloroso, muito eficaz contra bactérias – incluindo estafilococos resistentes à meticilina – esporos bacterianos, fungos e vírus (Miller et al., 2013), provocando a desnaturação e agregação das proteínas bacterianas (Jeffers, 2013). O hipoclorito de sódio a 5% diluído de 1:10, i.e. para 0,5%, parece ser bem tolerado (Miller et al., 2013). Bloom (2014) indica concentrações ainda menores, entre 0,06% a 0,12%, para foliculites superficiais por MRSP. De facto, no estudo de Pariser, Gard, Gram e Schmeitzel (2013), algumas estirpes apresentaram CIM entre 1:256 e 1:128, i.e. entre 0,024% e 0,048%. Não há ensaios clínicos com o hipoclorito de sódio ou o ácido hipocloroso em piodermite em cães, mas estes compostos são esporadicamente utilizados por vários autores, sobretudo contra estafilococos resistentes à meticilina (Jeffers, 2013; Miller et al., 2013; Morris, 2013a).

O lactato de etilo é um éster que, ao ser metabolizado pelas lipases bacterianas, origina etanol e ácido láctico. Os seus efeitos bactericidas derivam da solubilização dos lípidos pelo etanol e da diminuição de pH provocada pelo ácido láctico (Mueller et al., 2012). O lactato de etilo consegue, assim, penetrar nos folículos e nas glândulas sebáceas (Morris, 2013a; Rankin, Cain & Morris, 2015). Tendo em conta os poucos estudos clínicos e alguns dados contraditórios quanto à sua eficácia, inferior à da clorexidina, Mueller et al. (2012) não o recomendam.

O triclosan é um bisfenol com excelente ação antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e algumas Gram-negativas e fungos, incluindo leveduras (Heit & Riviere, 2009; McDonnell & Russell, 1999). É eficaz contra *S. pseudintermedius*, incluindo MRSP, estando descritas CIM $\leq 0,003$ mg/L para a maioria das estirpes (Couto, Belas, Couto, Perreten & Pomba, 2014) e até 0,5 mg/L (Valentine, Dew, Yu & Weese, 2012). O efeito antimicrobiano do triclosan parece depender da concentração, mas o seu mecanismo de ação é praticamente desconhecido. Esta substância faz parte da composição de alguns champôs, mas praticamente não existem estudos clínicos sobre a sua utilização em piodermite no cão (Mueller et al., 2012). Num estudo recente, uma preparação de gel com triclosan foi avaliada no tratamento de cães com pododermatite superficial, mas foi impossível determinar a contribuição específica do triclosan para a redução da carga microbiana, que os autores atribuíram essencialmente à remoção mecânica das bactérias e leveduras (Ortalda, Noli & Cena, 2016).

O ácido acético e o ácido bórico são pontualmente mencionados e Mueller et al. (2012) admitem que a combinação destes dois ácidos possa ser útil no tratamento de algumas infeções cutâneas. Em Medicina Veterinária, contudo, não há quaisquer estudos clínicos descritos sobre a utilização destes ácidos no tratamento de piodermite (Mueller et al., 2012) e os resultados dos estudos *in vitro* são contraditórios (Haesebrouck, Baele, De Keyser, Hermans & Pasmans, 2009; Swinney, Fazakerley, McEwan & Nuttall, 2008; Young et al., 2012). O ácido acético é mais conhecido

por ser o constituinte principal do vinagre e alegadamente possui uma boa ação antimicrobiana, independente da redução do pH, embora a acidificação do meio possa afetar os microrganismos (Matousek, Campbell, Kakoma & Schaeffer, 2003; Miller et al., 2013). Segundo Miller et al. (2013), a uma concentração de 5%, típica do vinagre, o ácido acético exerce ação bactericida contra estafilococos coagulase-positivos em apenas 5 minutos. No Homem, é aparentemente eficaz contra *P. aeruginosa* em concentrações de 0,5% a 5% e tem vindo a ser utilizado no tratamento de queimaduras (Nagoba, Selkar, Wadher & Gandhi, 2013; Ryssel et al., 2010). A sua eficácia contra os microrganismos comuns nesse tipo de feridas foi também confirmada no estudo de Halstead et al. (2015) contra microrganismos de vida livre e em biofilmes e microrganismos multirresistentes. O ácido bórico não parece ter qualquer ação antibacteriana relevante quando usado isoladamente. Segundo Miller et al. (2013), por exemplo, não é eficaz no tratamento de otites bacterianas. O ácido málico e o ácido láctico são ambos mencionados por Hillier et al. (2014) a título breve. Em Medicina Veterinária, não há ensaios clínicos sobre a utilização de ácido málico em piодermites. O ácido láctico é muito utilizado em preparações dermatológicas devido a propriedades hidratantes e esfoliantes (Emtestam, Kaaman & Rensfeldt, 2012), mas há escassos registos da sua utilização em dermatologia veterinária, excepto no tratamento da ictiose em cães (Miller et al., 2013; Muller, 1976).

O mel de grau clínico possui um largo espectro de ação, que abrange *S. pseudintermedius* e *S. aureus*, incluindo MRSP/MRSA, bem como estafilococos coagulase-negativos e *P. aeruginosa* (Jakobsson, 2011; Maruhashi et al., 2016; Mueller et al., 2012). Os fatores na génese dos seus efeitos antimicrobianos incluem a presença de oxidase da glicose – que origina peróxido de hidrogénio – uma elevada concentração de açúcares, propriedades higroscópicas e um baixo pH (Maruhashi, 2015; Mueller et al., 2012). Pode ser utilizado no tratamento de piодermites de superfície, em especial no intertrigo, para o qual a sua aplicação diária é tão eficaz como a de um champô de clorexidina a 3% aplicado três vezes por semana (Jakobsoon, 2011).

Os compostos de prata são muito utilizados nas piодermites por bactérias Gram-negativas, mas têm ação contra algumas Gram-positivas, embora não se saiba se contra *S. pseudintermedius* (Bloom, 2014). Os iões de prata ligam-se às proteínas do envelope celular, o que aumenta a sua permeabilidade e instabilidade e aos ácidos nucleicos, interferindo com o metabolismo e divisão celular (Miller et al., 2013; Mueller et al., 2012; Politano, Campbell, Rosenberger & Sawyer, 2013). A sulfadiazina de prata é o composto mais usado – geralmente sob a forma de creme a 1% (Morris, 2013a; Rankin et al., 2015) – e é eficaz em infeções localizadas por *P. aeruginosa* aplicada duas vezes por dia por três semanas (Hillier, Alcorn, Cole & Kowalski, 2006; Mueller et al., 2012). Há, porém, algum risco de irritação cutânea (Miller et al., 2013). A prata parece potenciar vários antibióticos (Morones-Ramirez, Winkler, Spina & Collins, 2013).

1.7.5.4. Antibióticos de uso tópico e utilização reservada

Há dois antibióticos cuja utilização por via tópica deverá ser reservada: a mupirocina e o ácido fusídico. O espectro de ação da mupirocina inclui a maioria das bactérias Gram-positivas, raras Gram-negativas e certos fungos (Hetem & Bonten, 2013; Poovelikunnel, Gethin & Humphreys, 2015; Werner & Russell, 1999). Em Medicina Humana, a mupirocina é utilizada no tratamento de algumas infeções bacterianas, nomeadamente impetigo, foliculites e furunculoses e no tratamento de feridas infetadas. Todavia, há cada vez mais recomendações no sentido de restringir a sua utilização indiscriminada, pois é o antimicrobiano de uso tópico mais eficaz para a descolonização nasal de MRSA, em doentes e profissionais de saúde, e a prevalência de resistência tende a aumentar (Poovelikunnel et al., 2015). De facto, a mupirocina integra os protocolos de descolonização de doentes portadores de MRSA e é essa a sua principal indicação terapêutica (Norma n.º 018/2014 de 09/12/2014; Poovelikunnel et al., 2015). Em Medicina Veterinária é utilizada sobretudo para piodermites localizadas (Hillier et al., 2014), mas as resistências a este antibiótico podem ser transmitidas horizontalmente entre estafilococos – incluindo entre *S. pseudintermedius* ou *S. schleiferi* e *S. aureus* – e, perante esse risco, há alguma preocupação em evitar a sua utilização desnecessária (Godbeer, Gold & Lawhon, 2013; Hillier et al., 2014; Mueller et al., 2012). Talvez por isso a prevalência desta resistência nos estafilococos implicados em Medicina Veterinária seja baixa – aparentemente mais comum entre *S. schleiferi* que *S. pseudintermedius* – e, na região de Lisboa, não parece estar a aumentar (Couto et al., 2016; Godbeer et al., 2013; Monchique, 2013). A recomendação da ISCAID é reservar a mupirocina para quando, conforme cultura bacteriana e CIM, não há outra alternativa e o tratamento tópico com antissépticos não foi eficaz (Hillier et al., 2014).

O ácido fusídico possui um espectro de ação muito limitado, pois a maioria das Gram-negativas é resistente e dentro das Gram-positivas é essencialmente eficaz contra estafilococos (Werner & Russell, 1999). A espécie *S. pseudintermedius* é habitualmente suscetível, mas pontualmente observam-se CIM elevadas (Clark, Loeffler & Bond, 2015; Loeffler et al., 2008; Valentine et al., 2012). No estudo de Couto et al. (2016), a prevalência da resistência ao ácido fusídico foi baixa e também não se detetou qualquer aumento. Tal como a mupirocina, o ácido fusídico é muito utilizado em Medicina Humana no tratamento tópico de infeções de pele, essencialmente por *S. aureus*, incluindo MRSA (Musmade, Tumkur, Trilok & Bairy, 2013). É também utilizado por via sistémica para infeções cutâneas graves e infeções ósseas e articulares (Fernandes, 2016). Os dados sobre a resistência ao ácido fusídico são muito variáveis, mas há uma noção geral de que a resistência tem aumentado, especialmente em estirpes de doentes dermatológicos, talvez por uma utilização crónica, incorreta (Shah & Mohanraj, 2003). Como a resistência ao ácido fusídico está relacionada com a sua utilização, recomenda-se que o tratamento de infeções

cutâneas não se prolongue para lá das duas semanas, i.e. que seja utilizado apenas a curto prazo (Heng et al., 2013). Embora possa ser utilizado no tratamento de certas piодermites localizadas, Hillier et al. (2014) recomendam que seja reservado a casos muito particulares.

1.8. DERMATITE POR *MALASSEZIA*

1.8.1. Fisiopatologia da infeção por *Malassezia*

A fisiopatologia da infeção por *Malassezia* permanece largamente desconhecida (Velegaki, Cafarchia, Gaitanis, Latta & Boekhout, 2015), mas são já conhecidos alguns dos fatores com relativa importância na alteração de estatuto destas leveduras, que a dado momento passam de comensais a patogénicas (Han et al., 2013). Habitualmente, estas leveduras obtêm os nutrientes que necessitam sem causar doença, i.e. mantendo um equilíbrio com a pele (Gaitanis, Velegaki, Mayser & Bassukas, 2013; Velegaki et al., 2015). A doença resulta, pois, de uma perturbação nesse equilíbrio (Gaitanis et al., 2013). De forma simplista, tem de haver um conjunto de mudanças a favor das leveduras, que lhes permita ultrapassar as barreiras e mecanismos do sistema imunitário da pele que normalmente impedem a sua proliferação (Cafarchia et al., 2005; Nuttall, 2003). A doença parece surgir, em primeiro lugar, devido a alterações externas às leveduras, que afetam a sua proliferação, por exemplo mudanças no microambiente cutâneo e/ou no sistema imunitário do hospedeiro; em segundo lugar, depois de interações entre as leveduras e as células da epiderme e o sistema imunitário e através da ação de fatores de virulência (Cafarchia & Otranto, 2008; Chen & Hill, 2005). As mudanças do microambiente mais relevantes são o aumento de humidade local e alterações na quantidade e/ou qualidade dos lípidos (Han et al., 2013; Miller et al., 2013; Nardoni et al., 2004). É, pois, fácil compreender que certas características ou estruturas anatómicas – por exemplo, pregas de pele ou excesso de pelo interdigital – e alterações bioquímicas, sobretudo da composição lipídica do estrato córneo – que se podem verificar numa série de circunstâncias, em doenças mais específicas da pele, como defeitos de queratinização, dermatite atópica e piодermites, ou doenças sistémicas, por exemplo endocrinopatias, especialmente hipotireoidismo – tenham potencial para induzir a proliferação destas leveduras (Chen & Hill, 2005; Nuttall, 2003). As *Malassezia* não invadem a pele para lá do estrato córneo (Miller et al., 2013), que colonizam até no infundíbulo dos folículos pilosos (Nuttall, 2003), portanto pensa-se que a dermatite resulte parcialmente da resposta inflamatória e/ou de reações de hipersensibilidade aos produtos e aos antígenos das leveduras (Chen & Hill, 2005; Gaitanis et al., 2013; Miller et al., 2013; Nardoni et al., 2004; Newbold et al., 2014).

1.8.1.1. Produção de biofilmes

A capacidade de produção de biofilmes parece intrínseca à *M. pachydermatis* (Bumroongthai, Chetanachan, Niyomtham, Yurayart & Prapasarakul, 2016; Figueredo, Cafarchia, Desantis & Otranto, 2012). A formação de biofilmes ocorre a partir de comunidades de microrganismos de uma única espécie ou de diferentes espécies fúngicas e/ou bacterianas que têm a capacidade de aderir firmemente a uma superfície da qual se tornam difíceis de remover (Bumroongthai et al., 2016; Figueredo, Cafarchia & Otranto, 2013). As células estão firmemente aderidas entre si e à superfície de ancoragem, rodeadas por uma matriz de substâncias poliméricas que mantém a coesão da estrutura e as protege da desidratação, da radiação ultravioleta, do sistema imunitário do hospedeiro e de compostos com ação antifúngica (Bumroongthai et al., 2016; Sardi et al., 2014). Com efeito, as leveduras em biofilmes são muito mais resistentes aos antifúngicos azóis que as suas equivalentes de vida livre (Bumroongthai et al., 2016; Figueredo et al., 2013; Jerzsele, Gyetvai, Csere & Gálfi, 2014). Esta estruturação permite a cooperação na degradação de nutrientes e a regulação comunitária da expressão de genes (Figueredo et al., 2013).

1.8.2. Sinais clínicos

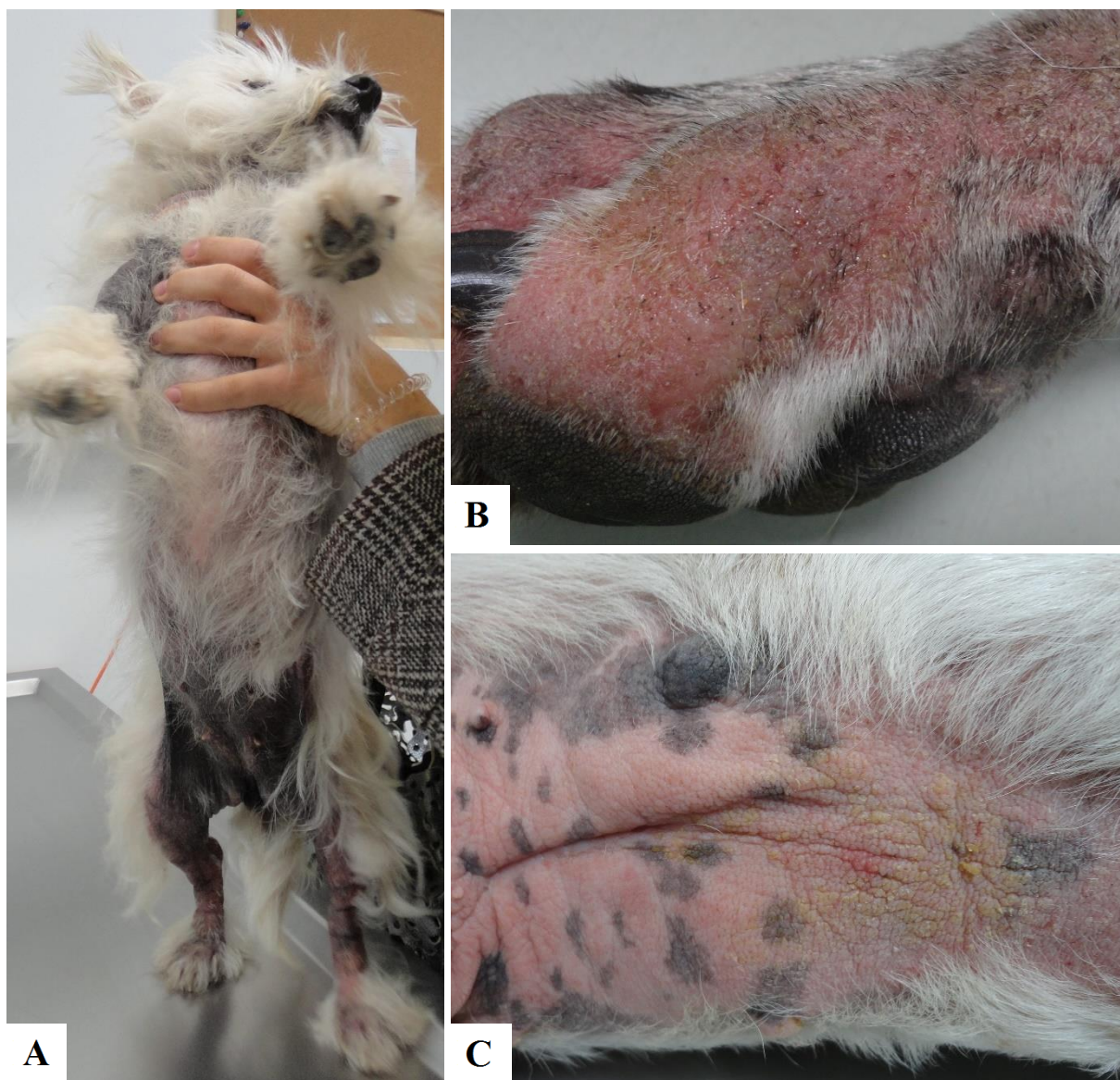
A dermatite por *Malassezia* pode ter várias apresentações clínicas localizadas ou assumir uma forma generalizada (Miller et al., 2013) (Figura 5, A). As regiões corporais mais comumente afetadas incluem a face, em especial a região periocular e perilabial, as extremidades podais, sobretudo a zona interdigital e as pregas ungueais, a região ventral do pescoço, as regiões axilar e inguinal, o períneo, a face ventral da cauda e quaisquer regiões intertriginosas (Miller et al., 2013; Morris, 2013b). Os doentes mostram habitualmente prurido intenso e o único sinal clínico é, muitas vezes, paroníquia, tendo a base da unha uma cor castanha avermelhada (Morris, 2013b). Podem exibir eritema intenso, seborreia – sobretudo oleosa ou dermatite seborreica, mas também seborreia seca – e lesões crostosas (Miller et al., 2013). Há também, geralmente, alguma alopecia. A hiperpigmentação e liquenificação estão associadas à progressão da doença. A dermatite por *Malassezia* pode ser facilmente confundida com piodermite (Figura 5, C), em especial quando os doentes apresentam lesões papulares e crostosas. Ademais, "cerca de 40% dos cães (...) tem infeção concomitante por estafilococos" (Miller et al., 2013) (Figura 5, B). O odor a ranço, às vezes nauseabundo, está muitas vezes presente, mas não é patognomónico.

1.8.3. Papel da clorexidina na dermatite por *Malassezia*

O tratamento tópico da dermatite por *Malassezia* é geralmente reservado para quando a infeção é localizada ou regional ou utilizado como adjuvante nas formas generalizadas. Alguns autores preferem um antifúngico de uso sistémico mesmo nas formas localizadas e só ponderam o

tratamento tópico perante uma contraindicação (Morris, 2013b), mas normalmente o tratamento tópico tem sempre benefícios (Miller et al., 2013). A longo prazo, i.e. quando a dermatite por *Malassezia* é recorrente e como tratamento preventivo, o tratamento tópico é preferível, porque é bastante mais seguro (Negre, Bensignor & Guillot, 2009).

Figura 5 – Dermatite por *Malassezia* (DM) vs. piodermite (fotografias da autora).



A – DM generalizada; alopecia extensa, eritema moderado, hiperpigmentação e liquenificação; B – foliculite e DM; alopecia, eritema intenso, crostas, erosões, pequenas fissuras e ligeiro exsudado. C – foliculite; alopecia, eritema moderado, liquenificação e acumulação de exsudado amarelado.

Conforme uma revisão sobre os tratamentos disponíveis, o único tratamento tópico para o qual havia evidências de eficácia consistentes utilizava um champô de gluconato de clorexidina e nitrato de miconazol a 2%, aplicado duas vezes por semana, durante três semanas (Negre et al., 2009), porém havia menção ao uso de um champô de gluconato de clorexidina a 3% com o mesmo protocolo, tendo 93% dos doentes apresentado cura citológica (Jasmin, Schroeder,

Briggs, Last & Sanquer, 2003). Entretanto surgiu um estudo que incluiu apenas cães com dermatite por *Malassezia* e avaliou um champô de digluconato de clorexidina a 3% num protocolo sequencial de três, duas e uma vez por semana, a cada duas semanas de tratamento, para um máximo de seis semanas, com resultados positivos e idênticos ao típico protocolo com o champô de clorexidina e miconazol (Maynard, Rème & Viaud, 2011).

As concentrações aparentemente mais eficazes contra *Malassezia* são as mesmas indicadas para *S. pseudintermedius*, i.e. 2% a 4% (Miller et al., 2013). Não se detetaram quaisquer diferenças entre diferentes champôs com concentrações entre 2% e 4% contra *M. pachydermatis in vitro* (Young et al., 2012) e sabe-se que a influência da formulação é talvez mais importante para a ação antifúngica da clorexidina que a concentração, pelo menos quanto às concentrações citadas (Lloyd & Lamport, 1999). A clorexidina está presente em vários champôs, inclusive combinada com imidazóis como o cetoconazol e o climbazol, que parecem ser eficazes (Miller et al., 2013), embora a dimensão dessa eficácia seja amplamente desconhecida por falta de ensaios clínicos e estudos *in vitro*. Apesar disso, começam a surgir mais estudos, especialmente *in vitro*, como o de Uri, Buckley, Marriage, McEwan e Schmidt (2016), no qual uma solução de gluconato de clorexidina a 4% apresentou CIM e CFM significativamente mais baixas que um champô de clorexidina a 3% com climbazol a 0,5%, embora ambos eficazes; ou o de Guardabassi (2016), no qual um champô com digluconato de clorexidina a 0,3%, ácido salicílico a 2%, gluconato de zinco a 2%, enxofre coloidal a 0,25% e lanolina etoxilada a 2% mostrou excelente eficácia *in vitro*. Quase todos os autores assinalam a vertente profilática da clorexidina, no entanto as implicações dessas recomendações são praticamente desconhecidas.

A clorexidina pode também ser aplicada sob a forma de solução de lavagem e, segundo Miller et al. (2013), esta é uma forma preferencial no tratamento de micoses superficiais generalizadas devido à maior ação residual. Ainda assim – e embora haja recomendações e alguns produtos comerciais nesse sentido – são raros os estudos sobre a eficácia e utilização da clorexidina em solução de lavagem – ou, genericamente, sobre quaisquer preparações que não champôs no tratamento tópico da dermatite por *Malassezia*. Um estudo sobre o uso de toalhetas comerciais impregnadas com digluconato de clorexidina a 0,3%, climbazol a 0,5%, gluconato de zinco a 1% e tris-EDTA mostrou que, em doentes com lesões localizadas, a aplicação dessas toalhetas, duas vezes por dia, durante quatro semanas, levou à resolução total ou a uma melhoria acentuada das lesões (Matic & Djuric, 2016). Esse estudo teve por base um estudo piloto que avaliou a eficácia das mesmas toalhetas na redução do número de leveduras na pele de cinco cães saudáveis, tendo as toalhetas sido eficazes quando aplicadas uma ou duas vezes por dia, em dias consecutivos, nas regiões axilar, inguinal, perianal e umbilical (Cavana et al., 2015).

2. POLIHEXANIDA

A polihexanida foi descoberta no início dos anos 50 por uma empresa britânica que investigava e sintetizava compostos antimaláricos, a *Imperial Chemical Industries, Ltd* (Kaehn, 2010). Não se revelou eficaz como antimalárico, mas demonstrou grande eficácia como antimicrobiano e um amplo espectro de ação. Nos 40 anos seguintes foi principalmente usada como desinfetante e conservante de cosméticos, sendo introduzida como antisséptico local no início dos anos 90 pelo cirurgião suíço Willenegger (Kaehn, 2010), tendo o seu uso aumentado exponencialmente.

2.1. VARIABILIDADE QUÍMICA

A polihexanida, tal como a clorexidina, pertence ao grupo das biguanidas poliméricas. Todavia, possui uma certa variabilidade química estrutural, influenciada pelo método de síntese e não se sabe que consequências isso possa ter, embora se comece agora a desvendar esse grande ponto de interrogação (Kaehn, 2010; Rembe, Fromm-Dornieden, Schäfer, Böhm & Stuermer, 2016). Portanto, na verdade, a polihexanida corresponde a uma família de polímeros quimicamente muito semelhantes (Souza, Ceridório, Paula, Mattoso & Oliveira, 2015). Ainda assim, o termo “polihexanida” é largamente utilizado como sinónimo de “polihexametileno biguanida”, pelo menos na área da Medicina, sendo este, talvez, o polímero da polihexanida mais estudado, sem dúvida resultado da sua excelente ação como antisséptico. Por outro lado, alguns consideram o nome “poliaminopropil biguanida” sinónimo de polihexanida e polihexametileno biguanida, quando esse nome indica realmente um polímero diferente que, ademais, parece ser ineficaz na erradicação de *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa* (Rembe et al., 2016).

2.2. AÇÃO ANTIMICROBIANA

2.2.1. Espectro de ação

O seu espectro inclui bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, incluindo bactérias capazes de produzir biofilmes e esporos, bactérias intracelulares, como *Chlamydia* ou *Mycoplasma*, fungos e alguns vírus (Hübner & Kramer, 2010). Assume particular importância por ser eficaz contra as bactérias que habitualmente colonizam feridas, como as do género *Staphylococcus* (Gilliver, 2009). No estudo de Fabry e Kock (2014), todos os isolados de *S. aureus*, incluindo MRSA e uma estirpe intermédia à vancomicina, foram suscetíveis, com a CIM e a concentração bactericida mínima (CBM) entre 0,5 e 2 mg/L. Os autores estudaram ainda a polihexanida associada a vários antibióticos e não observaram qualquer antagonismo, detetando alguma sinergia com a eritromicina, a doxiciclina e a linezolida. Contrariamente ao que tinha sido observado noutro estudo (Kapalschinski et al., 2013), a presença de albumina não afetou a ação antimicrobiana da polihexanida (Fabry & Kock, 2014).

No que respeita às bactérias Gram-negativas, existe um estudo *in vitro* importante que testou a polihexanida contra 250 isolados clínicos de *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *Moraxella catarrhalis* e *Haemophilus influenzae*, todos suscetíveis à polihexanida (Fabry, Kock & Vahlensieck, 2014). As CIM e CBM variaram entre 1 e 32 mg/L, com os valores mais elevados em isolados de *P. aeruginosa* e *H. influenzae*. A adição de albumina ao meio até 4% não alterou em nada as CIM e CBM (Fabry et al., 2014). Não se detetou qualquer associação entre CIM e CBM particulares e determinados padrões de resistência a antibióticos e a associação com amoxicilina, cefotaxima, imipenem, gentamicina e ciprofloxacina não resultou em qualquer interação (Fabry et al., 2014).

Há poucas referências a testes *in vitro* com isolados de pequenos animais, mas já foram testados alguns isolados de bactérias Gram-positivas – incluindo *S. pseudintermedius* e *S. schleiferi* ssp. *schleiferi* – de Gram-negativas – incluindo *E. coli* e *P. aeruginosa* – e de leveduras *Malassezia* (Banovic et al., 2013; Lee, Tobias, Bemis & Rohrbach, 2004), tendo a polihexanida sido eficaz. Encontrou-se somente mais uma referência à ação antifúngica da polihexanida contra leveduras *Malassezia*, nomeadamente *M. pachydermatis*, que é o estudo de Finger, Wiegand, Buschmann & Hipler (2012), no qual a polihexanida foi mais eficaz que a clorexidina e a iodopovidona.

2.2.2. Mecanismos de ação

2.2.2.1. Rotura membranária

O mecanismo de ação da polihexanida não é totalmente compreendido, mas por ser carregada positivamente tem afinidade para cargas negativas e, portanto, para a superfície das bactérias (Kaehn, 2010). Através de interações eletrostáticas, a polihexanida interage fortemente com os grupos fosfato dos glicerofosfolípidos, que existem em grande quantidade no envelope celular das bactérias, promovendo um aumento da fluidez e da permeabilidade da membrana celular, o que conduz à perda de iões potássio e outros elementos celulares e poderá levar à morte celular (Kaehn, 2010; Souza et al., 2015). Esta interação parece ser fundamental para a sua ação antimicrobiana, pois em estirpes de *E. coli* com depleção de fósforo do meio foi constatada uma aparente tolerância à sua ação, a par com uma redução do conteúdo celular em fosfatidilglicerol (Broxton, Woodcock, Heatley & Gilbert, 1984; Gilliver, 2009; Souza et al., 2015). Há, ainda, uma série de outras estruturas de alta afinidade para a polihexanida, como lipopolissacarídeos, ácidos teicoicos e peptidoglicanos (Kaehn, 2010). Outros autores sugeriram que as alterações membranárias provocadas pela polihexanida se devam também a interações hidrofóbicas e à desidratação de grupos polares (Souza et al., 2015).

2.2.2.2. Condensação seletiva dos cromossomas

Havia já alguma noção de que a polihexanida teria também efeitos a nível intracelular, muito possivelmente através da sua ligação aos ácidos nucleicos (Gilliver, 2009; Hübner & Kramer, 2010), mas sabe-se, agora, que o papel intracelular da polihexanida pode ser inclusive mais importante para a sua ação antimicrobiana que as alterações membranárias que possa induzir. Chindera et al. (2016) demonstraram que a polihexanida entra nas células bacterianas, para a divisão celular e condensa os cromossomas, sugerindo que este possa ser o mecanismo principal – ou um dos mecanismos principais – da sua ação antimicrobiana, pois não encontraram grandes evidências de que promovesse, efetivamente, a lise celular bacteriana ou alterações relevantes da permeabilidade membranária. Este mecanismo pode ajudar a explicar a ação da polihexanida contra microrganismos que não bactérias, como fungos e agentes patogénicos intracelulares. O mesmo grupo constatou que a polihexanida é capaz de matar protozoários *Leishmania major* e que tal parece acontecer através de rotura membranária e lesões provocadas nos cromossomas do parasita (Firdessa et al., 2015). Esta condensação parece ser seletiva para os microrganismos em questão e não para as células do hospedeiro, sendo a polihexanida excluída do núcleo das células de mamíferos e confinada a endossomas (Chindera et al., 2016; Firdessa et al., 2015).

2.3. O QUE DISTINGUE A POLIHEXANIDA?

2.3.1. Principais vantagens

A polihexanida possui um largo espetro de ação, mas o que a distingue dos outros antissépticos é a relação entre a sua eficácia antimicrobiana e a sua excelente compatibilidade com os tecidos – ou, em geral, a sua baixa citotoxicidade – que globalmente traduz um elevado índice de biocompatibilidade (Hübner & Kramer, 2010) (Tabela 2). O índice de biocompatibilidade pode ser usado como indicador do desempenho esperado de um antisséptico e determina-se através de um teste de citotoxicidade no qual fibroblastos de ratinho, num meio de cultura suplementado com 10% de soro bovino, são expostos ao antisséptico durante 30 minutos e através de um teste para quantificar a atividade antimicrobiana desse antisséptico, geralmente contra *E. coli* e *S. aureus*, sendo calculado o rácio entre a concentração molar que provoca lesões em 50% dos fibroblastos e a concentração molar que provoca uma redução de 3 log₁₀ na quantidade de UFC, que indica uma redução de cerca de 99,9% (Eberlein & Assadian, 2010; Hübner & Kramer, 2010; Müller & Kramer, 2008).

Tabela 2 – Índice de biocompatibilidade para alguns antissépticos – tradução livre da tabela 1 do artigo de Eberlein e Assadian (2010), complementada com dados de Müller e Kramer (2008).

Substância	Índice de biocompatibilidade			
	Células L929*/ <i>E. coli</i>		Células L929*/ <i>S. aureus</i>	
	A&K ⁽¹⁾	M&K ⁽²⁾	A&K ⁽¹⁾	M&K ⁽²⁾
Dicloridrato de octenidina	1,8	1,73	1,5	2,11
Polihexanida	1,5	1,51	1,3	1,36
Iodopovidona (solução)	1,0	0,68	0,9	0,68
Digluconato de clorexidina	0,8	0,83	0,7	0,98
Proteína de prata	0,13	0,22	-	0,11
Sulfadiazina de prata	<0,004	-	-	-
Nitrato de prata	<0,002	-	-	-
Cloreto de benzalcónio	-	0,63	-	0,79
Triclosan	-	0,23	-	0,46

* Fibroblastos de ratinho.

⁽¹⁾ Assadian e Kramer, 2008 (citado por Eberlein e Assadian, 2010).

⁽²⁾ Müller e Kramer, 2008.

Adicionalmente, este antisséptico parece ter um efeito positivo na cicatrização e apresenta boa tolerância clínica (Kaehn, 2010). De facto, a polihexanida tem sido cada vez mais utilizada no tratamento de feridas das mais diversas origens quer sob a forma de solução ou gel, quer incorporada em material de penso e observa-se um número crescente de artigos referentes a ensaios clínicos e estudos de caso em feridas agudas, crónicas, infetadas e/ou colonizadas (Eberlein & Assadian, 2010; Eberlein & Kanis, 2014; Hübner & Kramer, 2010). No entanto, há alguma escassez de ensaios clínicos randomizados, controlados e de larga escala e se, por um lado, a polihexanida é já recomendada por alguns autores como um antisséptico de primeira linha no tratamento de feridas infetadas ou criticamente colonizadas (Dissemond et al., 2010; Dissemond et al., 2014; Kaehn, 2010) e utilizada regularmente na prática clínica (Eberlein & Kanis, 2014; Ferreira dos Santos & Moreira da Silva, 2011; Wounds International, 2014), outros ainda mantêm algumas reservas (Fjeld & Langaas, 2016).

2.3.2. Outras características importantes

Este antisséptico liga-se à superfície das células, pelo que possui um efeito residual prolongado por várias horas (Kaehn, 2010), contudo não é absorvido pela pele intacta nem quando aplicado em feridas, não tendo, pois, absorção sistémica (Ferreira dos Santos & Moreira da Silva, 2011). Embora se saiba muito pouco sobre os mecanismos através dos quais a polihexanida promove a cicatrização, sabe-se que não induz maceração dos tecidos adjacentes, não desidrata o leito da

ferida e não interfere com o processo de granulação, o que contribui para uma cicatrização sem complicações (Ferreira dos Santos & Moreira da Silva, 2011). Ademais, parece ter propriedades anti-inflamatórias (Wiegand, Abel, Ruth & Hipler, 2008, citado por Eberlein & Assadian, 2010) e começam a surgir estudos direcionados para os seus efeitos na microcirculação cutânea, na epitelização e na angiogénese (Goertz et al., 2015). A polihexanida promove a eliminação de placas de fibrina *in vitro* (Körber, Seipp & Hofmann, 2008) e, também, *in vivo*, pois no estudo de Daeschlein et al. (2007), no qual a polihexanida foi avaliada no tratamento parcial de úlceras de decúbito e em queimaduras de 2.º grau, não se observou acumulação de exsudados ricos em fibrina, em oposição ao verificado nas regiões tratadas com iodopovidona ou nitrato de prata.

2.4. UTILIZAÇÃO EM MEDICINA HUMANA

2.4.1. Indicações e contraindicações

A polihexanida está indicada no tratamento de feridas criticamente colonizadas e infetadas, o que inclui feridas cirúrgicas, feridas traumáticas, queimaduras de 1.º e 2.º grau, úlceras crónicas da perna, úlceras de pressão e úlceras do pé diabético (Bradbury & Fletcher, 2011; Eberlein & Kanis, 2014) (Figuras 7 e 8, ponto 2.6.2.). Pode também ser utilizada em feridas cavitárias, abscessos e fístulas e no ponto de entrada de cateteres urinários e sondas alimentares (Bradbury & Fletcher, 2011) e está ainda indicada no tratamento da queratite por *Acanthamoeba* e como alternativa à iodopovidona na preparação cirúrgica de doentes para cirurgia de catarata (Creytens, Goossens, Faber, Ebo & Aerts, 2014). A polihexanida está contraindicada na lavagem peritoneal e intra-articular, em aplicações relacionadas com o sistema nervoso central, no ouvido médio ou interno e a nível intraocular (Eberlein & Assadian, 2010). Ademais, deverá haver algum cuidado com os doentes alérgicos à clorexidina, pois poderão estar em risco de reações alérgicas à polihexanida (Kautz, Schumann, Degerbeck, Venemalm & Jakob, 2010).

2.4.2. Questões práticas

A polihexanida é geralmente utilizada em concentrações de 0,01% a 0,5% e recomenda-se um tempo de contacto mínimo de 10 minutos, porque alegadamente – e contrariamente ao que se verificou, por exemplo, no estudo de López-Rojas, Fernández-Cuenca, Serrano-Rocha & Pascual (2017) – o seu efeito bactericida não é imediato (Dissemond et al., 2014; Eberlein & Assadian, 2010). Ainda que a duração do tratamento com antisséptico não deva exceder as duas a três semanas (Dissemond et al., 2010) pode prolongar-se em certas circunstâncias. A mais óbvia é quando um doente possui um risco elevado de recontaminação, podendo o tratamento ativo passar diretamente para um tratamento preventivo (Dissemond et al., 2010; Eberlein & Assadian, 2010). Contudo, se a infeção está controlada e não há riscos acrescidos para o doente,

“o uso permanente, injustificado e inespecífico” da polihexanida não se justifica (Dissemond et al., 2010; Eberlein & Assadian, 2010).

Ao contrário da clorexidina, a polihexanida é muito solúvel em água (Küsters, Beyer, Kutscher, Schlesinger & Gerhartz, 2013), pelo que não necessita de ser utilizada sob a forma de sal. É muito estável nas preparações farmacêuticas e relativamente resistente a grandes diferenças de temperatura e a condições de oxidação. Em condições muito ácidas ou alcalinas, há uma degradação moderada, sendo a estabilidade melhor para valores de pH entre 5 e 7 e ideal para pH=6 (Küsters et al., 2013). Este antisséptico é compatível com outros produtos utilizados habitualmente no tratamento de feridas (Ferreira dos Santos & Moreira da Silva, 2011), mas é sensato advertir para eventuais interações, especialmente com substâncias altamente aniónicas, com as quais a polihexanida é incompatível e bases fortes ou fosfatos compostos, que podem provocar a sua precipitação (Hübner & Kramer, 2010). A polihexanida é inibida pela mucina (Ansorg, Rath & Frabry, 2003) e pelo sulfato de condroitina (Müller & Kramer, 2000). Por outro lado, a sua ação antimicrobiana não parece ser afetada pela presença de sangue ou albumina (Hübner & Kramer, 2010), apesar de haver alguns estudos contraditórios.

2.4.3. Toxicidade e reações adversas

A polihexanida não causa dor ou desconforto ao ser aplicada no Homem e tem um baixíssimo potencial alergénico (Eberlein & Assadian, 2010; Hübner & Kramer, 2010). Em termos globais, o seu perfil de toxicidade é excelente (Tabela 3) e tendencialmente superior ao de outros antissépticos de utilização comum (Kaehn, 2010).

Tabela 3 – Dados toxicológicos exploratórios dos antissépticos mais comuns em comparação com a polihexanida – tradução livre da tabela 3 do artigo de Kaehn (2010).

Antisséptico	Irritação cutânea	Irritação de mucosas/feridas	Potencial alergénico	Toxicidade	MUTAG	CARCIN	TERAT
Cloreto de benzalcónio	++	++	++	+ / ++ ⁽¹⁾	–	?	?
Clorexidina	+	+ / ++	+	++ ⁽¹⁾	+	+ ⁽²⁾	–
Octenidina	±	++ / +++	–	+	–	–	–
Polihexanida	–	–	±	±	–	–	(+) ⁽³⁾
Iodopovidona	–	+ / ++	+ / ++	+	–	–	–

CARCIN – carcinogenicidade; MUTAG – mutagenicidade; TERAT – teratogenicidade.

– falta de evidência; ± muito baixo(a); + baixo(a); ++ moderado(a); +++ elevado(a); ? dados insuficientes

⁽¹⁾ Neurotóxico.

⁽²⁾ Alterações pré-malignas.

⁽³⁾ Utilizada em concentrações muito acima das recomendadas.

Embora a polihexanida seja bastante segura estão já descritos alguns casos de hipersensibilidade imediata a este antisséptico, designadamente algumas situações de anafilaxia e de síndromes urticariformes (Creytens et al., 2014; Ferrarini, Baggi, Flückiger & Bianchetti, 2006; Kautz et al., 2010; Olivieri, Eigenmann & Hauser, 1998; Schrøder, Kirketerp-Møller & Winther, 2014). Kautz et al. (2010) foram os únicos que demonstraram reatividade cruzada com a clorexidina, sendo as IgE do doente mais ávidas para a polihexanida do que para a clorexidina. A frequência de sensibilização à polihexanida ronda os 0,5%, valor que pode ser sobrestimado devido a reações falso-positivas (Schnuch, Geier, Uter, Basketter & Jowsey, 2007). Por conseguinte, a polihexanida permanece uma substância sensibilizadora pouco comum (Schnuch et al., 2007). Embora a dermatite de contacto alérgica à polihexanida tenha, aparentemente, um carácter ocupacional (Schnuch et al., 2007) têm sido esporadicamente descritos alguns casos associados à utilização de produtos de higiene e/ou cosméticos que a incluem – ou à poliaminopropil biguanida – como conservante (Leysen, Goossens, Lambert & Aerts, 2014) e também alguns associados às suas aplicações médicas (Bervoets & Aerts, 2016). Como todos os antissépticos, a polihexanida tem potencial para atuar como irritante cutâneo (Lachapelle, 2014), mas não há grandes evidências a esse respeito, embora Bervoets & Aerts (2016) refiram que algumas reações fracas nos testes epicutâneos (também denominados testes ou provas de contacto ou *patch tests*) poderão traduzir uma dermatite de contacto irritativa.

2.5. UTILIZAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

As referências à utilização da polihexanida em Medicina Veterinária, sobretudo na clínica de pequenos animais, são escassas. A polihexanida tem sido essencialmente utilizada na medicina de animais exóticos, silvestres e de zoo devido a uma série de produtos lançados sob a marca F10® (Health and Hygiene (Pty) Ltd, África do Sul), cujas formulações mais relevantes no presente contexto incluem um desinfetante e uma solução antisséptica, concentrados e diluídos de 1:250 e um champô. Todos os produtos têm cloreto de benzalcónio e polihexanida, mas há alguma inconsistência quanto às concentrações de polihexanida, especialmente no que respeita ao desinfetante concentrado. Estes produtos foram já utilizados numa grande diversidade de animais, incluindo mamíferos, aves, répteis e anfíbios (Barrows, 2007). O desinfetante tem sido principalmente utilizado nas diluições de 1:250, 1:300 e 1:500 no tratamento de infeções respiratórias por nebulização e lavagens nasais/dos seios nasais (Barrows, 2007; Chitty, 2006; Stanford, 2006), no tratamento de infeções cutâneas fúngicas e bacterianas, através de banhos completos ou parciais (Elliot, 2007; Samour & Naldo, 2008; Scheelings, Dobson, Hooper & Eden, 2015) e como solução de lavagem e irrigação na preparação do leito de feridas (Barrows, 2007; Elliot, 2007; Gardner & Le Rochais, 2009; Le Grange, 2013; Slabber, 2008). Todas as

referências são relatos de casos e seria talvez benéfico avaliar estes produtos num contexto de ensaio clínico, nas espécies em que tal fosse possível. Há, ainda, um estudo em papagaios *Amazona aestiva* com um gel de polihexanida a 0,1% aplicado diariamente e comparativamente a uma solução de NaCl a 0,9% em feridas cutâneas assépticas e apesar de os resultados terem sido idênticos ao controlo, a autora refere que a polihexanida talvez se mostrasse superior num estudo com feridas infetadas (Silva, 2012). Noutro estudo semelhante, realizado em leitões, a polihexanida a 0,04% promoveu a fase final da cicatrização de feridas superficiais, assépticas (Kramer, Roth, Müller, Rudolph & Klöcker, 2004). Adicionalmente, há uma série de estudos em ratos e murganhos sobre os efeitos da polihexanida na microcirculação e nalguns parâmetros macro-hemodinâmicos, na angiogénese e na epitelização (Frieling et al., 2006; Frieling et al., 2007; Goertz et al., 2011; Goertz et al., 2015; Langer et al., 2004).

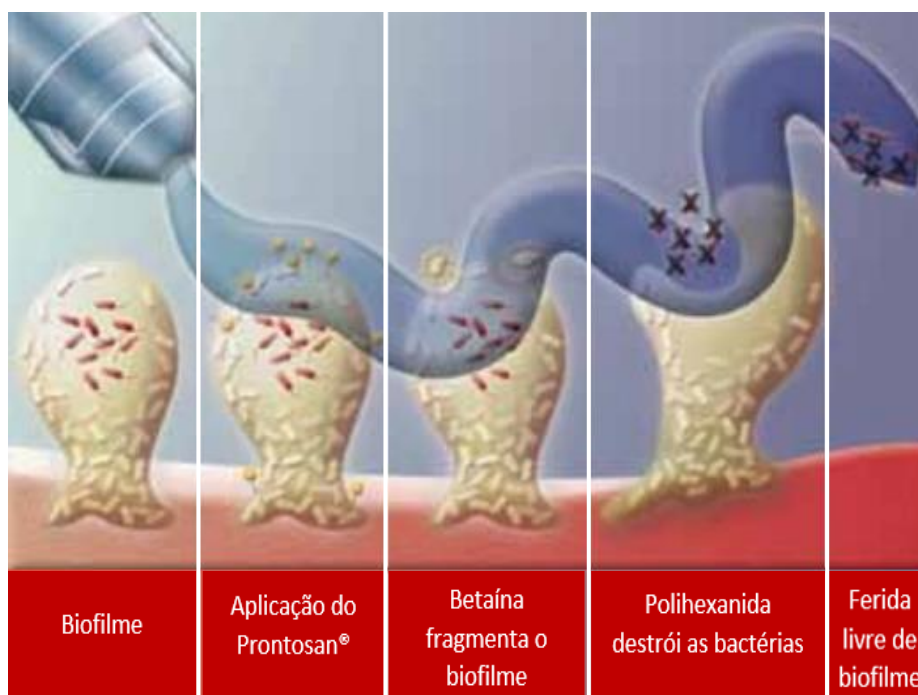
Quanto à utilização da polihexanida no cão há ainda menos informação. Há um estudo de caso sobre uma cadela, da raça Baixote, com perfuração e destruição da parede abdominal lateral associada a perfuração intestinal, cuja reconstrução da parede abdominal incluiu terapia de pressão negativa com irrigação da ferida com polihexanida a 0,04% (Nolff, Layer & Meyer-Lindenberg, 2015). A ferida estava colonizada por bactérias multirresistentes da espécie *S. pseudintermedius*, mas não houve quaisquer complicações pós-cirúrgicas associadas a infeção, tendo sido iniciada antibioterapia com amoxicilina/ácido clavulânico de acordo com o TSA. Há ainda uma referência a um estudo clínico que avaliou os efeitos de uma solução de polihexanida a 0,1%, comparativamente a uma solução de eletrólitos, na cicatrização de abrasões e feridas por mordedura em cães e gatos, tendo a polihexanida reduzido a ocorrência de complicações, nomeadamente necrose, deiscência das suturas e exsudados purulentos, o que contribuiu para uma menor necessidade de consultas e tratamentos subsequentes; adicionalmente, parece ter favorecido a cicatrização das abrasões nos poucos gatos avaliados (Hübler, 2009).

2.6. PRONTOSAN®

O Prontosan® solução de irrigação é produzido pela B. Braun (em Portugal, B. Braun Medical, Lda.) e contém 0,1% de polihexanida (polihexametileno biguanida), 0,1% de betaína e água purificada. A betaína é um surfactante anfótero que lhe confere uma tensão superficial menor que a da água, o que permite uma melhor remoção de detritos e bactérias do leito das feridas; ademais, interfere com a produção de lactonas acil-hemoserinas, moléculas envolvidas no *quorum sensing*, o que dá ao Prontosan® uma boa capacidade de remoção de biofilmes (Bradbury & Fletcher, 2011) (Figura 6). Pensa-se que os mecanismos envolvidos na acumulação de polihexanida na matriz dos biofilmes variem com a sua concentração, i.e. que em concentrações baixas predominem interações eletrostáticas e em concentrações elevadas

predominem ligações por pontes de hidrogénio (Kaehn, 2010). A polihexanida impede a fixação dos microrganismos, pelo que, além de atuar em biofilmes já instalados, previne também a formação de novos biofilmes (Hübner & Kramer, 2010).

Figura 6 – Ação do Prontosan® em biofilmes (Bradbury & Fletcher, 2011). Imagem reproduzida com permissão da *Wounds International*.



2.6.1. Ação antimicrobiana *in vitro*

O Prontosan® solução foi eficaz *in vitro* contra um largo espectro de microrganismos, entre os quais *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, incluindo estirpes resistentes à vancomicina, *E. coli*, MSSA, MRSA, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *S. epidermidis* e *Candida albicans* (Stolarick et al., 2010). Com o Prontosan® gel, Siegel et al. (2012) constatarem grandes reduções populacionais, ao longo de oito semanas com uma exposição inicial e uma segunda exposição na 4.^a semana, para algumas daquelas espécies e *Corynebacterium minutissimum*, *P. acnes* e *Trichophyton rubrum*. Lessing e McNulty (2012) verificaram uma redução de 7 log nas UFC/cm² em biofilmes de *P. aeruginosa* e *S. aureus* submetidos a exposições intermitentes do Prontosan® solução. Este produto foi também recentemente testado em isolados clínicos de bactérias multirresistentes e não só apresentou boa atividade bactericida, com CIM e CBM entre 0,5 mg/L e 8 mg/L, como esta ocorreu rapidamente, em apenas 1 minuto de exposição à solução comercial (López-Rojas et al., 2017).

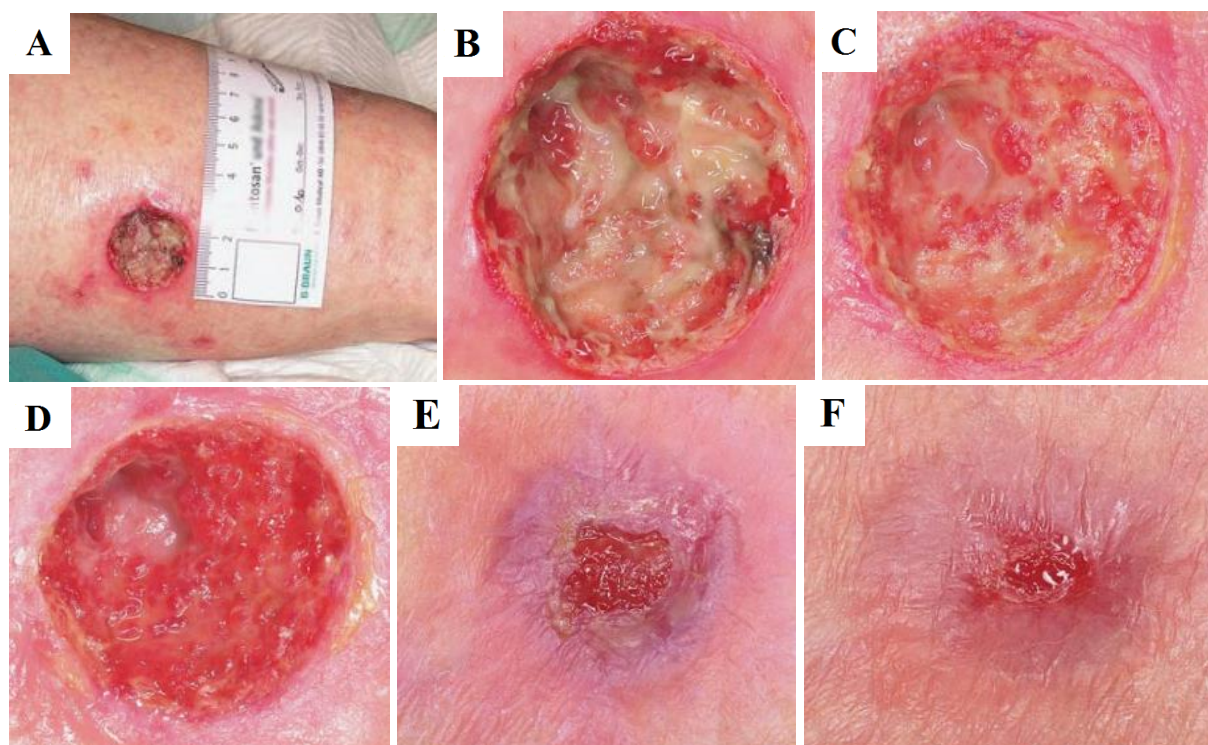
2.6.2. Exemplos práticos da sua aplicação

Figura 7 – Prontosan® solução aplicado numa úlcera da perna com 17 meses de duração num doente com doença venosa crónica – ferida infetada, sem melhorias com antibiótico e pensos de prata e carvão ativado. Imagens reproduzidas com permissão da B. Braun (*B. Braun European Case Study Booklet (2010): Effectiveness of Prontosan® Solution and Gel on variety of wounds types*, pp. 64-65, <http://www.prontosan.co.uk/casestudies.html>).



A – antes da lavagem e irrigação; B – 42 dias depois, após lavagem e irrigação.

Figura 8 – Prontosan® solução aplicado numa ferida da perna com 4 meses de duração, infetada e sem melhorias na cicatrização com a utilização de um penso de prata iónica. Imagens reproduzidas com permissão da B. Braun (*B. Braun European Case Study Booklet (2010): Effectiveness of Prontosan® Solution and Gel on variety of wounds types*, pp. 66-67, <http://www.prontosan.co.uk/casestudies.html>).



A – antes da lavagem e irrigação; B – no mesmo dia, após lavagem e irrigação; C – 6 dias depois; D – 13 dias depois; E – 30 dias depois; F – 65 dias depois.

III – A POLIHEXANIDA NO CONTROLO DE INFECÇÕES BACTERIANAS E POR *MALASSEZIA*: ESTUDO CLÍNICO PRELIMINAR NO CÃO

1. OBJETIVOS

Este estudo pretendeu investigar a eficácia da polihexanida no controlo de infeções de pele localizadas, de superfície ou superficiais, de origem bacteriana e/ou por *Malassezia*, no cão e, adicionalmente, comparar essa eficácia à da clorexidina para os mesmos tipos de infeção.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. INTRODUÇÃO

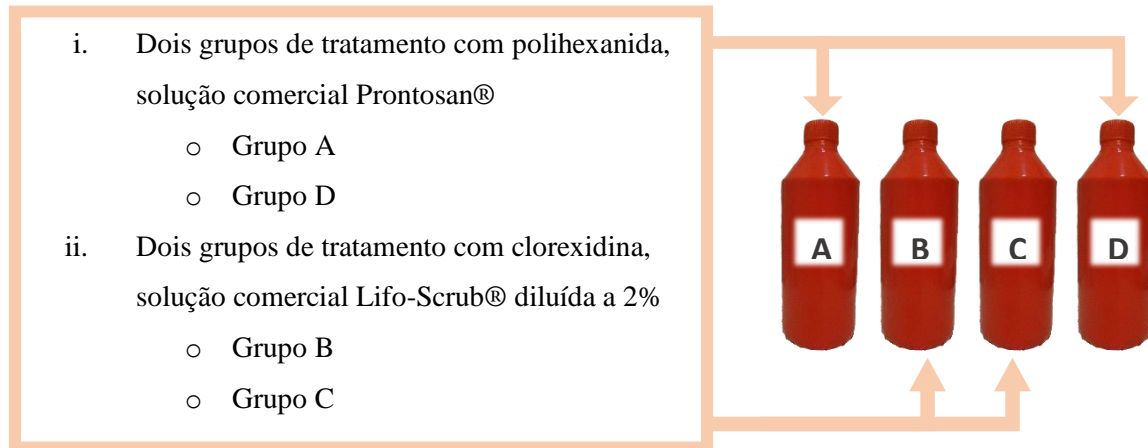
O projeto decorreu no Hospital Escolar da FMV-ULisboa e pretendeu envolver os médicos-veterinários do Hospital na fase de recrutamento para que a amostra incluísse não só doentes avaliados na consulta de referência de Dermatologia, mas também doentes avaliados nas consultas de Medicina. Para dar a conhecer o projeto no Hospital Escolar foi elaborada uma apresentação em suporte digital com a motivação para a escolha do tema, enquadramento clínico, desenho experimental e gestão da inclusão dos doentes inicialmente avaliados na consulta de Medicina Geral (Anexo 1). Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética e Bem-Estar Animal (CEBEA) da FMV-ULisboa. Todos os participantes assinaram uma declaração de consentimento informado (Anexo 2) no dia em que os doentes a seu cargo foram incluídos no projeto.

2.2. DESENHO EXPERIMENTAL

Este projeto consistiu num ensaio clínico randomizado, controlado e duplo-cego, com grupos paralelos. Os doentes foram distribuídos por um de quatro grupos de tratamento, identificados de acordo com uma sequência de letras gerada de forma aleatória por uma pessoa externa ao projeto. Estes quatro grupos de tratamento consistiram em dois grupos de tratamento com polihexanida a 0,1% (Prontosan® solução de irrigação de feridas, B. Braun Medical, Lda, Portugal) – grupos A e D – e dois grupos de tratamento com clorexidina a 2% (diluição de Lifo-Scrub® solução antisséptica aquosa de digluconato de clorexidina 4%, B. Braun Medical, Lda, Portugal) – grupos B e C (Figura 9). O desenho experimental de grupos paralelos, duplicados, foi concebido para minimizar os vieses das investigadoras e dos participantes. Os dois grupos de tratamento com clorexidina formaram o grupo de controlo, enquanto os grupos de tratamento com polihexanida constituíram o grupo experimental. A pessoa que criou a sequência de distribuição aleatória identificou os frascos que continham as preparações e foi a única a saber a que tratamento correspondia cada letra no decorrer de todo o ensaio clínico. O código foi revelado à estagiária e à orientadora apenas após o término do projeto, na fase de

análise de dados. O primeiro doente foi distribuído para um dos grupos de forma aleatória, escolhido ao acaso por outra pessoa não relacionada com o projeto. A partir daí, os doentes foram incluídos segundo a sequência de letras A-B-C-D.

Figura 9 – Braços do estudo.



Para garantir o carácter duplo-cego deste ensaio clínico e considerando que a solução de clorexidina é cor-de-rosa e a solução de polihexanida transparente, todos os frascos destinados a conter as preparações foram revestidos de igual forma com papel adesivo, totalmente opaco, que impedisse qualquer vislumbre do seu interior na consulta (Figura 10). Adicionalmente, as pessoas responsáveis pela aplicação do tratamento aos doentes foram instruídas para evitarem quaisquer comentários sobre a cor ou cheiro da solução de lavagem, tanto com a estagiária como com a orientadora, durante as consultas, por telefone ou por correio electrónico. Os participantes desconheciam o tratamento atribuído ao doente, pois nunca lhes foi transmitida qualquer indicação sobre o aspeto que cada uma das preparações teria. A fase de recrutamento decorreu de 26 de Janeiro a 30 de Junho de 2015.

Figura 10 – Processo de revestimento dos frascos que continham quer a polihexanida a 0,1% quer a clorexidina a 2%.



2.3. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DE CLOREXIDINA

A solução de digluconato de clorexidina a 4%, de pH=6, foi diluída com água mineral natural, também de pH=6. Essa diluição foi preparada misturando 3 L da solução de clorexidina a 4% com 3 L de água mineral.

2.4. ELEGIBILIDADE

Para o estudo clínico foram considerados elegíveis os cães com idade igual ou superior a 12 meses e diagnóstico de infecção cutânea localizada, por bactérias e/ou leveduras *Malassezia* (ver a Tabela 4 para consulta dos critérios de elegibilidade detalhados). A inclusão no estudo clínico foi independente do sexo e da raça do doente.

Tabela 4 – Critérios de elegibilidade.

Critérios de inclusão	
i.	Cão com idade igual ou superior a 12 meses;
ii.	Piodermite de superfície ou superficial, localizada, com ou sem sobrecrecimento de <i>Malassezia</i> , quer em fase inicial, i.e. primeira apresentação, quer em recidiva ou episódio recorrente;
iii.	Dermatite por <i>Malassezia</i> , localizada, confirmada por citologia cutânea.
Critérios de exclusão	
iv.	Fêmea gestante ou lactante;
v.	Piodermite profunda, difusa e/ou gravemente debilitante, que exija antibióticos de uso sistêmico;
vi.	Dermatite por <i>Malassezia</i> , generalizada;
vii.	Tratamento com antibióticos e/ou antifúngicos de uso sistêmico nas duas semanas anteriores à avaliação para inclusão no estudo clínico;
viii.	Tratamento com antibióticos e/ou antifúngicos de uso tópico na semana anterior à avaliação para inclusão no estudo clínico;
ix.	Episódio passado de reação adversa (ou suspeita de reação adversa) à clorexidina.

2.5. DIAGNÓSTICO DE INFEÇÃO CUTÂNEA

O diagnóstico considerou-se válido apenas se, em conjunto com os sinais clínicos típicos, fosse observado: sobrecrecimento bacteriano, nas piodermites de superfície, bactérias fagocitadas por células inflamatórias, no caso das piodermites superficiais e sobrecrecimento de leveduras *Malassezia*, na dermatite por *Malassezia*. A recolha das amostras para citologia cutânea foi preferencialmente feita por punção de pústulas, quando disponíveis, pela técnica da fita adesiva, nas lesões mais representativas e, quando necessário, pela técnica de aposição direta. Todas as

amostras foram coradas com a coloração Diff-Quik®, que é a coloração utilizada regularmente para o diagnóstico citológico na consulta de referência de Dermatologia no Hospital Escolar.

2.6. PROTOCOLO DE TRATAMENTO

2.6.1. Modo e frequência de aplicação

O tratamento consistiu na aplicação de discos desmaquilhantes totalmente impregnados com a solução de lavagem nas áreas infetadas, uma vez por dia, preferencialmente de vinte e quatro em vinte e quatro horas. Após uma primeira demonstração na consulta de inclusão no projeto e facultadas todas as instruções quanto à forma e frequência de aplicação, o tratamento seria aplicado em casa, pela pessoa responsável pelo doente. As instruções foram idênticas para todos os grupos. Assim, o modo de aplicação não deveria ser excessivamente abrasivo e deveria permitir um contacto completo da solução antisséptica com a área a tratar. Adicionalmente, para um tempo de exposição adequado, as zonas de lesão deveriam estar em contacto com a solução pelo menos 10 a 15 minutos após a sua aplicação (Miller et al., 2013; Dissemond et al., 2010), portanto o doente teria de ser vigiado durante esse período e distraído para, assim, evitar que lambesse a zona e removesse o antisséptico ou prejudicasse a sua ação.

2.6.2. Duração

Inicialmente estava programado que a duração do tratamento com antisséptico não excederia os vinte e um dias, segundo o indicado por Dissemond et al. (2010) para o tratamento de feridas infetadas com polihexanida e seguindo o esquema de Loeffler et al. (2011) quanto ao tratamento de piодermites superficiais com clorexidina. Contudo, esse protocolo foi repensado e, tendo em conta as recomendações de Hillier et al. (2014) quanto aos antimicrobianos de uso tópico no tratamento da foliculite bacteriana superficial, bem como a falta de estudos quanto à duração ótima deste tipo de tratamentos, decidiu-se que o tratamento poderia ser prolongado mediante algumas condições.

O período de vinte e um dias foi entendido como adequado para fazer um ponto de situação, avaliar os riscos e benefícios de continuar o tratamento tópico em exclusivo e ponderar a introdução de antibioterapia sistémica. Assumiu-se que o tratamento com antisséptico em exclusivo poderia ser prolongado nas seguintes situações: se se observasse uma melhoria clínica óbvia no decorrer dessas três semanas iniciais; se houvesse um benefício claro para o doente em adiar a mudança de um tratamento tópico para um tratamento administrado pela via oral, por exemplo na presença de alterações gastrointestinais; e/ou se os responsáveis pelo doente manifestassem vontade de continuar o tratamento tópico, desde que obrigatoriamente observada a primeira condição e após discussão das opções de tratamento alternativas. Da mesma forma,

o tratamento para lá dos vinte e um dias só poderia continuar perante uma melhoria clínica contínua, sem qualquer deterioração do estado clínico, preferencialmente apenas até às quatro semanas de tratamento, i.e. até cerca de trinta dias de tratamento e seria suspenso no caso de não se observar qualquer melhoria clínica em qualquer uma das consultas de reavaliação após as três semanas e até ao limite máximo de seis semanas de tratamento. Foi também decidido que não seria efetuado qualquer período de possível prevenção antisséptica, ou seja, não haveria qualquer prolongamento da aplicação da solução antisséptica após a resolução da infeção, mesmo que se alcançasse a cura clínica antes dos vinte e um dias. Embora tal conceito possa ser aceitável no que respeita à polihexanida, que é muito segura para os tecidos (Eberlein & Assadian, 2010), o mesmo pode não ser aplicável à clorexidina. Além disso, desconhecem-se largamente as consequências desse tipo de utilização dos antissépticos. O tratamento antisséptico seria e foi, portanto, interrompido com a resolução dos sinais clínicos e citológicos de infeção.

2.6.3. Tratamentos concomitantes

Durante o tratamento com clorexidina ou polihexanida, não foi permitida a utilização tópica de qualquer outro fármaco, incluindo antibióticos, antifúngicos e antiparasitários ou de qualquer outro tipo de preparação, incluindo champôs. A única exceção foram os glucocorticoides que, apesar de proibidos nas zonas onde o antisséptico seria aplicado e nas zonas relativamente próximas, podiam ser aplicados em zonas muito restritas e afastadas das primeiras, como por exemplo no pavilhão auricular.

A utilização de qualquer antibiótico ou antifúngico de uso sistémico ficou interdita. Por outro lado, os glucocorticoides de uso sistémico foram permitidos em doses anti-inflamatórias, pois muitos dos doentes presentes à consulta de referência de Dermatologia têm doença alérgica e não seria correto privá-los do possível benefício desta medicação. Assim, quando necessário, podia adicionar-se prednisolona ao plano de tratamento, no regime habitualmente utilizado pela orientadora no manejo terapêutico destes doentes, i.e. na dose de 0,5 a 1 mg/kg, administrada uma vez por dia, durante três a cinco dias.

Se houvesse conhecimento da aplicação ou administração de algum produto não permitido, o doente seria retirado do estudo.

2.6.4. Seguimento clínico

Para cada doente, o dia de inclusão no projeto foi considerado o dia zero do tratamento. Embora estivesse prevista uma reavaliação semanal após o dia zero, a intervalos de tempo regulares, de preferência ao 7.º, 14.º e 21.º dias – ou de sete em sete dias até ao término do tratamento – era

esperada alguma variação neste sentido e, por conseguinte, admitiu-se um intervalo máximo de duas semanas entre cada consulta. Quando possível, seria efetuada uma consulta de reavaliação do doente uma a duas semanas após o término do tratamento. Foi feito o acompanhamento de todos os doentes nos meses que se seguiram à sua participação no ensaio clínico, nalguns casos apenas por acompanhamento da ficha clínica, noutros casos diretamente em consulta, tendo o último contacto com 88,9% dos participantes sido estabelecido por correio eletrónico e/ou por telefone cerca de 10 meses após o término do projeto.

2.7. BACTERIOLOGIA

Recolheu-se uma amostra cutânea de todos os doentes com infeção bacteriana identificada na consulta de inclusão no projeto. Estas amostras foram recolhidas por zaragatoa e encaminhadas para o Laboratório de Resistência aos Antibióticos e Biocidas (LRAB) da FMV-ULisboa para cultura e TSA/CIM. No caso das piodermites superficiais, a amostra foi recolhida, sempre que possível, de uma pústula intacta ao exame físico e perfurada por uma agulha esterilizada no momento da recolha. Nos doentes com mais do que uma pústula visível, a amostra foi recolhida de apenas uma dessas lesões, já que é aceitável assumir que a mesma estirpe bacteriana possa estar presente em várias pústulas do mesmo doente (Pinchbeck et al., 2007). Na ausência de pústulas observáveis a olho nú, as amostras foram recolhidas de crostas, colaretos, pápulas e, na falta de lesões evidentes, de uma área de pele representativa (Gortel, 2013).

2.8. INDICADORES PRIMÁRIOS – AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA CLÍNICA

2.8.1. *Score* clínico

A cada doente e em cada consulta de avaliação, desde a consulta de inclusão no projeto, foi atribuído um *score* clínico. Esse *score* foi elaborado com base no tipo de lesões selecionadas para avaliação e na forma como essa avaliação foi feita noutros estudos clínicos prévios e pode ser consultado no Anexo 3 (Curtis, Lamport & Lloyd, 2006; Loeffler et al., 2011; Murayama et al., 2010b; Olivry, Saridomichelakis, Nuttall, Bensignor, Griffin & Hill, 2014). Foram avaliados oito tipos de lesões, que constituem as lesões mais características de piodermites de superfície e piodermites superficiais e que incluem pápulas, pústulas, colaretos epidérmicos, crostas, seborreia, eritema, alopecia e erosões/úlceras. A cada tipo de lesão foi atribuída uma pontuação entre 0 e 3, que traduzia a frequência, distribuição e, globalmente, a gravidade das lesões, segundo o seguinte esquema: 0 – ausente; 1 – poucas lesões dispersas ou ocasionais/ grau ligeiro; 2 – muitas lesões dispersas ou lesões frequentes/ grau moderado; 3 – muitas lesões confluentes/ grave. A soma do *score* de cada lesão permitiu atribuir a cada doente um *score* clínico global (mínimo – 0; máximo – 24). De acrescentar que a presença de outras lesões, como

máculas, vesículas, nódulos, quistos, liquenificação, comedões, fístulas e hiperpigmentação, foi também registada, embora as mesmas não tenham sido avaliadas segundo um *score* clínico. Sempre que possível, a atribuição do *score* foi efetuada pela estagiária e pela orientadora, de forma independente, para posterior avaliação da concordância.

2.8.2. *Score* citológico

Estava prevista a realização de citologia cutânea das lesões dermatológicas de cada doente, em cada consulta, desde o dia zero. Dada a restrição de tempo, o exame citológico no decorrer das consultas foi essencialmente qualitativo, tendo as amostras sido avaliadas quanto à presença de bactérias, leveduras e células inflamatórias e, no que respeita às bactérias em concreto, quanto ao tipo morfológico – cocos e/ou bastonetes – e localização – intra e/ou extracelular, além de se efetuar uma apreciação subjetiva global da quantidade de bactérias e leveduras, classificada como escassa, moderada ou elevada. Independentemente da avaliação citológica durante as consultas, todas as lâminas foram mais tarde examinadas e avaliadas segundo o método semiquantitativo descrito por Budach e Mueller (2012), cuja base para classificação está exposta na Tabela 5. De acordo com este método, foi atribuída uma pontuação de 0 a 4+ a cada uma de seis categorias: “cocos”, “bastonetes”, “leveduras”, “neutrófilos”, “eosinófilos” e “macrófagos”. A soma das pontuações atribuídas às categorias de microrganismos, “cocos”, “bastonetes” e “leveduras”, resultou na obtenção de um *score* citológico total para avaliar a progressão concreta da infeção (R.S. Mueller, comunicação pessoal, 13 de junho, 2016).

Tabela 5 – Método semiquantitativo para descrever os resultados do exame citológico – tradução livre, tal como descrito por Budach e Mueller (2012).

Classificação	Descrição qualitativa correspondente
0	Sem bactérias ⁽¹⁾ /leveduras/células inflamatórias ⁽²⁾
1+	Bactérias ⁽¹⁾ /leveduras/células inflamatórias ⁽²⁾ ocasionalmente presentes, mas a lâmina tem de ser meticolosamente examinada para permitir a sua deteção
2+	Bactérias ⁽¹⁾ /leveduras/células inflamatórias ⁽²⁾ presentes em número reduzido, mas rapidamente detetáveis, sem dificuldades
3+	Bactérias ⁽¹⁾ /leveduras/células inflamatórias ⁽²⁾ presentes em grande número, rapidamente detetáveis, sem dificuldades
4+	Quantidade massiva de bactérias ⁽¹⁾ /leveduras/células inflamatórias ⁽²⁾ , rapidamente detetáveis, sem dificuldades

⁽¹⁾ Referente às categorias “cocos” e “bastonetes”.

⁽²⁾ Referente às categorias “neutrófilos”, “eosinófilos” e “macrófagos”.

2.9. INDICADORES SECUNDÁRIOS

2.9.1. Grau de prurido

Em todas as consultas de avaliação, desde o dia zero, foi pedida uma avaliação do prurido do doente à pessoa encarregue do seu tratamento. A avaliação foi preferencialmente feita pela mesma pessoa em todas as fases. Embora estivesse prevista a utilização de uma escala visual analógica, modificada, tal como descrita por Hill, Lau e Rybníček (2007) e Rybníček, Lau-Gillard, Harvey e Hill (2009) – e embora essa escala tenha sido inicialmente utilizada (Anexo 4) – constatou-se alguma dificuldade na sua aplicação durante as consultas. Essa dificuldade derivou, em parte, das restrições de tempo, mas deveu-se sobretudo ao facto de ser um processo moroso e exigente. Quando questionadas sobre a facilidade de utilização da escala, todas as pessoas mencionaram a natureza exaustiva da leitura das descrições orientativas que, mesmo assim, não eram muitas vezes suficientes para o preenchimento da escala, sendo necessárias explicações adicionais. Adicionalmente, as classificações obtidas rondaram sempre os pontos da escala próximos das descrições, o que denunciou uma tendência aparente para a aglomeração das classificações, embora Hill et al. (2007) tenham manifestado essa preocupação e referido que, no seu estudo, tal não se observou. Por estes motivos, optou-se pela utilização de uma escala numérica, sendo colocada a questão quanto ao grau de comichão/desconforto do doente e pedida uma avaliação entre 0 e 10, considerando que “0” corresponderia a um cão que não se coça, lambe ou esfrega mais do que o normal, i.e. muito esporadicamente e “10” indicaria uma situação totalmente oposta, de prurido extremamente intenso, i.e. um cão que se coça, lambe, arranha ou esfrega constantemente, mesmo durante as refeições – e durante a consulta – e independentemente do que se passe em seu redor, havendo necessidade de alguma forma de contenção física.

2.9.2. Registo fotográfico e avaliação subjetiva da melhoria clínica

O registo fotográfico das lesões de cada doente foi efetuado em todas as consultas. No final do projeto foi elaborado um questionário *online* por cada doente (Anexo 5), enviado por correio eletrónico à pessoa responsável pelo tratamento, no qual se pediu uma avaliação quantitativa e uma avaliação qualitativa do grau de melhoria das lesões no final do tratamento em relação ao dia zero. Esse questionário incluiu o registo fotográfico do doente, organizado sequencialmente, por data e dia do tratamento.

2.9.3. Questionário global de participação

Em conjunto com o questionário individual atrás referido foi também enviado um questionário geral (Anexo 6), de preenchimento *online*, anónimo, com cinco questões relativas ao tratamento

realizado e à participação do doente no projeto. Pretendeu-se detetar eventuais problemas que pudessem estar na base de uma fraca adesão à terapêutica, nomeadamente quanto à facilidade de aplicação do tratamento e às características físicas das preparações utilizadas, bem como ter uma melhor perceção do efeito real que o tratamento teve na qualidade de vida dos doentes e, ainda, descobrir aspetos a serem melhorados, por exemplo em relação ao desenho experimental ou à forma como o ensaio clínico foi conduzido. Todos os questionários foram elaborados na página de Formulários do Google (<https://www.google.com/forms/about/>).

2.10. AGRAVAMENTO DO ESTADO CLÍNICO

Caso se verificasse um agravamento do estado clínico do doente, traduzido por um aumento do *score* clínico, estavam previstas diferentes formas de atuação dependendo da fase do tratamento em que o doente se encontrasse, da evolução do *score* citológico e, também, do grau de prurido. Regra geral, se numa fase muito inicial, i.e. na primeira avaliação e até cerca de uma semana após o início do tratamento, o protocolo terapêutico seria revisto com a pessoa responsável pela aplicação do tratamento, quer para corrigir eventuais erros relacionados com a perceção incorreta do protocolo, quer para melhorar a adesão ao tratamento, permanecendo o doente no projeto até à avaliação seguinte. A exceção seria uma deterioração óbvia do estado clínico do doente ou uma grande alteração no *score* citológico, sem qualquer relação aparente com uma fraca adesão. Numa fase mais avançada, i.e. por volta das duas semanas de tratamento, um aumento do *score* clínico, a par com um aumento do *score* citológico e/ou do prurido, levaria a que o doente fosse retirado do estudo e dirigido para um plano terapêutico diferente. Qualquer aumento do *score* clínico após as três semanas de tratamento corresponderia à retirada do doente do projeto. No caso de um *score* clínico estagnado, o *score* citológico seria o segundo critério com maior peso na decisão de continuar ou suspender o tratamento com biocida. No caso de cura citológica até à terceira semana, mas sem melhoria ou perante um agravamento do estado clínico, o tratamento com antisséptico seria, de qualquer forma, suspenso.

2.11. REAÇÕES ADVERSAS

A anamnese na consulta de inclusão englobou questões sobre os tratamentos médicos prévios e eventuais episódios de reação adversa ou suspeita de reação adversa à clorexidina ou a outros antissépticos ou preparações de uso tópico. Embora o risco de reação adversa fosse considerado mínimo, todas as pessoas foram alertadas para a participação imediata de quaisquer efeitos que considerassem estranhos/anormais nos doentes a seu cargo e que causassem preocupação sob a suspeita de possível reação adversa, sobretudo se esses efeitos fossem observados imediatamente

após a aplicação do antisséptico. Este aspeto foi avaliado em todas as consultas no decorrer do tratamento. Perante a suspeita de reação adversa, o doente seria retirado do ensaio clínico.

2.12. ABANDONO OU RETIRADA – *DROPOUTS*

2.12.1. Abandono ou escolha voluntária

A pessoa responsável pelo doente tinha o direito de, a qualquer momento, retirar o doente do ensaio clínico, caso fosse sua vontade. Nesta situação e em qualquer caso em que se verificasse perda de seguimento, i.e., a não comparência às consultas de avaliação, os doentes seriam considerados *dropouts*.

2.12.2. Retirada

Todos os doentes retirados do ensaio clínico por violação grave do protocolo, agravamento do estado clínico ou reação adversa seriam também considerados *dropouts*.

2.13. PLANEAMENTO DA ANÁLISE DE RESULTADOS E MÉTODOS ESTATÍSTICOS

A base de dados deste projeto foi elaborada no Microsoft Excel 2013. Com exceção de alguns dos gráficos apresentados na caracterização da amostra, produzidos no Microsoft Excel 2013 e do gráfico Bland-Altman produzido no programa de estatística MedCalc, desenvolvido para Windows e disponível em <https://www.medcalc.org/>, toda a análise estatística foi efetuada no programa R – *The R Project for Statistical Computing*, versão 3.3.0 para Windows, adquirido através da rede de distribuição do R, designada *The Comprehensive R Archive Network* – CRAN, disponível em <https://cran.r-project.org/>.

O tamanho da amostra inicialmente calculado foi de 15 doentes por grupo de tratamento, num total de 30. No decorrer do ensaio clínico tornou-se óbvia a dificuldade de recrutamento e tendo em conta o caráter preliminar do projeto admitiu-se um total de 20 doentes, i.e. 10 por grupo.

A caracterização da amostra foi efetuada com estatística descritiva básica, procurando avaliar sempre a eficiência da randomização através da comparação, entre os grupos de tratamento, de algumas características principais dos perfis clínicos dos doentes. Para este último efeito foram também utilizados alguns testes estatísticos inferenciais, nomeadamente o teste *t* de Student e o teste-*U* de Mann-Whitney. A escolha dos testes estatísticos adequados incluiu a verificação dos pressupostos para a sua correta utilização. Quando referida, a média de uma variável é sempre apresentada com o respetivo desvio padrão ($M \pm s$).

Para verificar a concordância entre a estagiária e a orientadora na atribuição do *score* clínico foi utilizado o método de Bland-Altman e o teste de Wilcoxon (*Wilcoxon signed rank test*). Os

scores clínicos utilizados na avaliação dos indicadores primários são aqueles atribuídos pela estagiária; os *scores* clínicos da orientadora foram apenas considerados nesta análise particular. Dado o caráter preliminar deste ensaio clínico, a análise de eficácia seguiu dois caminhos: um foi o da análise segundo o princípio da intenção de tratar (*intention-to-treat analysis* – *ITT analysis*, daqui para a frente designada “análise ITT”); o outro foi o da análise somente relativa aos doentes que completaram o tratamento de acordo com o indicado no protocolo terapêutico (*per protocol analysis* – *PP analysis*, daqui em diante designada “análise PP”). Para a análise ITT, os dados ausentes foram estimados através do método da última observação realizada (*last observation carried forward* – *LOCF*). Os pressupostos da inclusão dos doentes na análise PP foram a existência de registo das observações relativas aos indicadores primários nos períodos de tempo pretendidos para análise e a ausência de desvios relevantes ao protocolo estabelecido (Agência Europeia de Medicamentos, 1998). Tanto a análise ITT como a análise PP tiveram em conta o período crítico das três semanas após início do tratamento e seguiram uma estratégia idêntica para avaliar os indicadores primários e o grau de prurido. Esta estratégia incluiu dois passos: primeiro, para cada doente e indicador, o cálculo da diferença entre a medição registada no dia zero e a medição registada no período das três semanas pós-inclusão; depois, para cada indicador, a comparação dessas diferenças entre grupos de tratamento através do teste-*U* de Mann-Whitney. Foi ainda efetuada uma análise de sobrevivência com o método Kaplan-Meier, cujo evento de interesse foi a redução de pelo menos 50% do *score* clínico a par com a resolução citológica da infeção. Adicionalmente, foram também exploradas as estimativas Kaplan-Meier para outros dois potenciais eventos de interesse: a cura clínica e a cura citológica. Os doentes sem qualquer registo após a consulta de inclusão foram excluídos das análises de sobrevivência, pelo que estas foram efetuadas para N=18 (grupo Clor, n=10; grupo P, n=8).

Para todos os testes de hipóteses efetuados considerou-se um nível de significância (α) de 5%. Perante a impossibilidade de avaliar todos os doentes exatamente no mesmo dia do tratamento e para facilitar a análise de dados, as avaliações foram agrupadas em 6 períodos de tempo, nomeadamente T0, T1, T2, T3, T4, T5 e T6, correspondendo T0 ao dia de inclusão no projeto. O período T1 engloba a 1.^a semana de tratamento, mas na prática corresponde ao dia 7 ± 3 dias, ou seja, abrange os dias 4 a 10 do tratamento. O período T2 engloba a 2.^a semana de tratamento ou observação e traduz o dia 14 ± 3 dias, i.e. inclui os dias 11 a 17 após inclusão. O período T3 refere-se à 3.^a semana de seguimento, concretamente ao dia 21 ± 3 dias, pelo que inclui os dias 18 a 24 após inclusão. De acordo com a mesma lógica, os períodos T4, T5 e T6 correspondem, respetivamente, à 4.^a, 5.^a e 6.^a semana de seguimento, traduzindo respetivamente os dias 28 ± 3 dias, 35 ± 3 dias e 42 ± 3 dias.

3. RESULTADOS

3.1. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Neste estudo foram incluídos 18 cães com infecção cutânea localizada (Anexo 7), mas um deles foi considerado elegível para uma segunda participação devido ao facto de ter desenvolvido um tipo de infecção com apresentação e localização totalmente diferentes da infecção inicial durante a sua participação no projeto. Desta forma obtiveram-se dois registos diferentes para o mesmo doente, pelo que para a análise de eficácia foram consideradas 19 unidades experimentais. Dos 18 cães incluídos, 10 foram designados para os grupos de tratamento com clorexidina (grupo Clor) e 8 para os grupos de tratamento com polihexanida (grupo P). Por questões práticas, para o cão incluído duas vezes foi permitida a utilização do antisséptico atribuído inicialmente, o que resultou em mais uma unidade experimental para o grupo P.

Tabela 6 – Estatística descritiva relativa à idade e ao peso dos doentes na amostra total (N=18) e por grupo de tratamento (grupo Clor, n=10; grupo P, n=8).

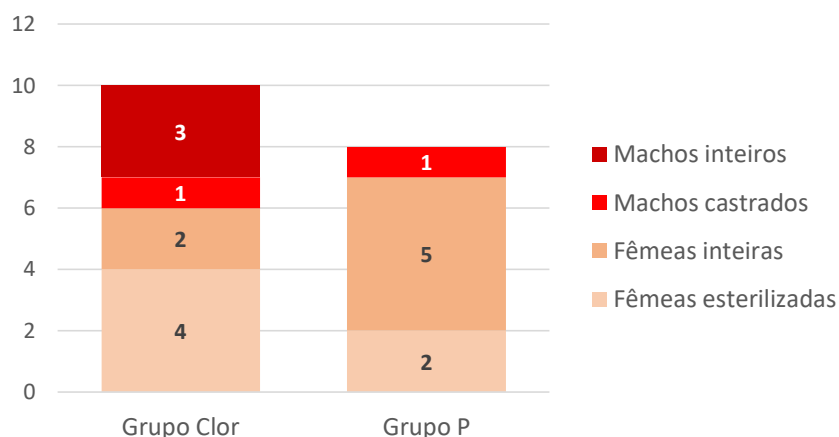
	Idade (anos)				Peso (kg)					
	<i>Mdn</i>	<i>IQR</i>	mín.	máx.	<i>M</i>	<i>s</i>	<i>Mdn</i>	<i>IQR</i>	mín.	máx.
Total	4,50	5,75	1	11	23,961	15,016	24,400	24,575	2,700	49,000
Clor	4,50	6,75	1	9	23,950	17,618	22,750	28,625	2,700	49,000
P	4,50	2,50	1	11	23,975	12,185	24,400	20,075	7,700	41,000

IQR – *interquartile range*, amplitude interquartil; *M* – média; máx. – máximo; *Mdn* – mediana; mín. – mínimo; *s* – desvio padrão.

A mediana da idade em ambos os grupos foi de 4,5 anos, tendo as idades variado entre 1 e 9 anos no grupo Clor e 1 e 11 anos no grupo P. Embora a amplitude de idades seja maior no grupo P (10 vs. 8 anos no grupo Clor), a amplitude interquartil de 2,50 anos neste grupo e 6,75 anos no grupo Clor indica que a dispersão de valores é maior no grupo Clor, portanto no grupo P havia uma menor variabilidade de idades (Tabela 6). Segundo o teste-*U* de Mann-Whitney, não houve diferença estatística significativa entre os grupos quanto à idade ($p=0,591$). O peso médio no grupo Clor foi de, aproximadamente, $24\pm 17,62$ kg, mas variou entre 2,7 e 49 kg; no grupo P foi de, sensivelmente, $24\pm 12,19$ kg e variou entre 7,7 e 41 kg. Segundo o teste *t* de Student para amostras independentes, também não houve diferença estatística significativa entre os grupos quanto ao peso ($p=0,997$).

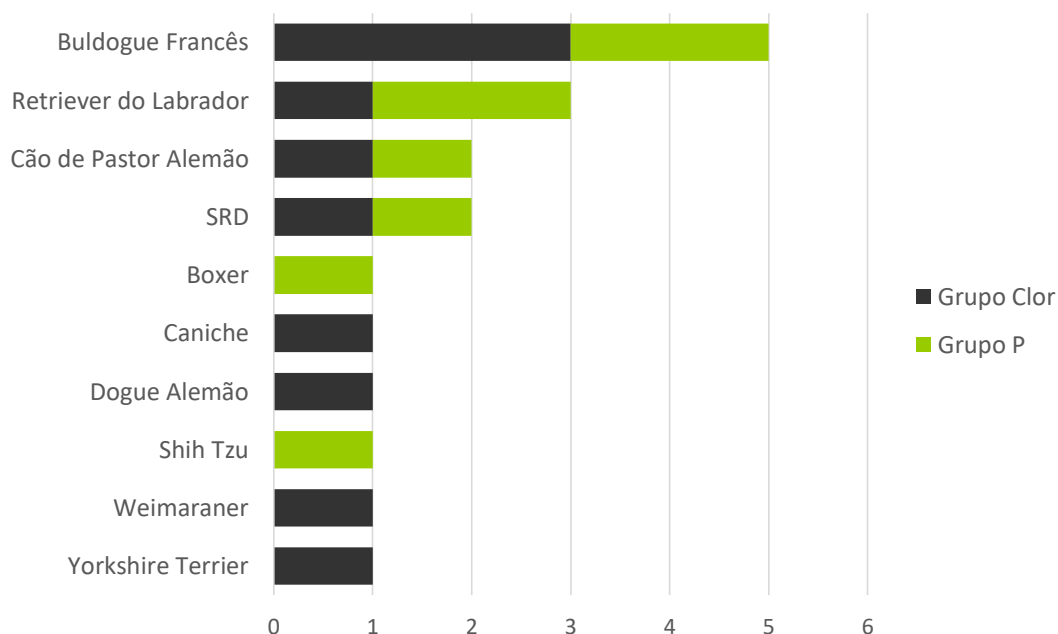
O grupo Clor incluiu seis (60%) fêmeas, quatro das quais esterilizadas e quatro (40%) machos, dos quais um castrado. O grupo P incluiu sete fêmeas (87,5%), duas das quais esterilizadas e um (12,5%) macho castrado (Figura 11).

Figura 11 – Sexo e estado reprodutivo dos doentes por grupo de tratamento (N=18).



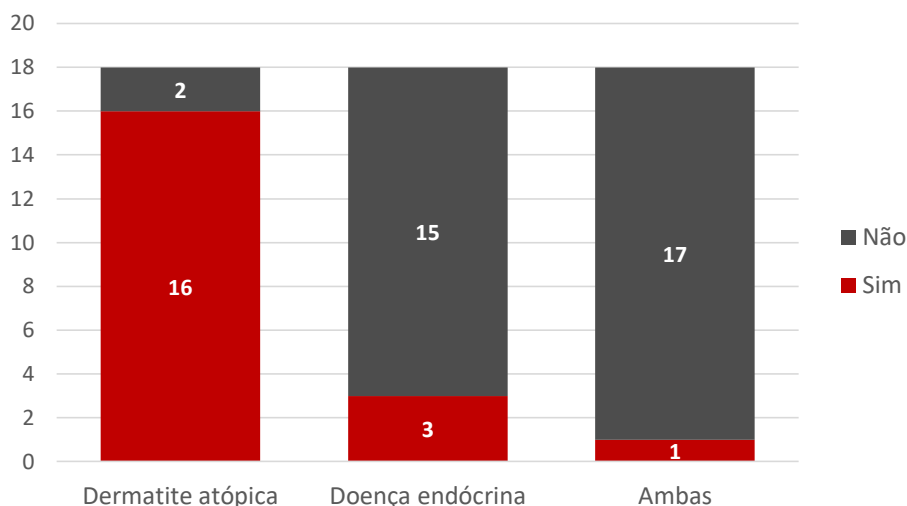
Num total de 9 raças representadas neste ensaio clínico, a raça Buldogue Francês foi a mais frequente, representada por 27,78% dos doentes (5/18), seguida pelas raças Retriever do Labrador e Cão de Pastor Alemão, respetivamente 16,67% (3/18) e 11,11% (2/18) dos doentes. Dois (11,1%) doentes não tinham raça definida. Constata-se que as raças mais frequentes estiveram representadas pelo menos uma vez em cada grupo de tratamento (Figura 12).

Figura 12 – Distribuição das raças dos doentes por grupo de tratamento (N=18).



É de realçar que foi encontrada pelo menos uma doença predisponente para infeção cutânea em todos os doentes incluídos: 88,9% (16/18) tinham dermatite atópica e 16,7% (3/18) tinham pelo menos uma doença do foro endócrino (Figura 13). Há, aqui, uma sobreposição, pois um dos doentes com dermatite atópica tinha também hipotireoidismo. Dos outros dois doentes com doença endócrina, um tinha hipoadrenocorticismismo congénito e o outro tinha hipotireoidismo, com suspeita de hiperadrenocorticismismo concomitante (Anexo 8).

Figura 13 – Doenças predisponentes a infecção cutânea nos doentes incluídos (N=18).



3.1.1. Caracterização quanto à infecção

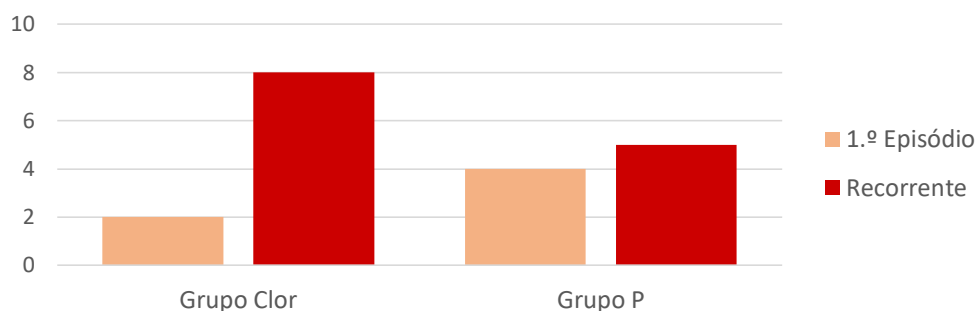
Para esta caracterização consideraram-se as 19 unidades experimentais (Anexo 12). As infeções exclusivamente bacterianas foram as mais prevalentes, refletindo 57,9% dos doentes, seguidas pelas infeções mistas, i.e., com componente bacteriana e fúngica, cuja prevalência foi de 31,6%. As infeções exclusivamente fúngicas, i.e. por leveduras *Malassezia*, sem qualquer componente bacteriana, constituíram 10,5% dos casos. A distribuição dos diferentes tipos de infeção em cada grupo de tratamento seguiu uma distribuição semelhante à da amostra total: no grupo Clor, a prevalência das infeções bacterianas, mistas e fúngicas foi de, respetivamente, 60%, 30% e 10%, enquanto no grupo P foi de 55,6%, 33,3% e 11,1% (Tabela 7).

Tabela 7 – Distribuição dos doentes na globalidade da amostra e por grupo de tratamento consoante o tipo de agente etiológico envolvido; n.º de doentes (frequência relativa, %).

	Tipo de infeção			Total
	Bacteriana	Fúngica	Mista	
Grupo Clor (N=10)	6 (60,0%)	1 (10,0%)	3 (30,0%)	10 (100%)
Grupo P (N=9)	5 (55,6%)	1 (11,1%)	3 (33,3%)	9 (100%)
Total (N=19)	11 (57,9%)	2 (10,5%)	6 (31,6%)	19 (100%)

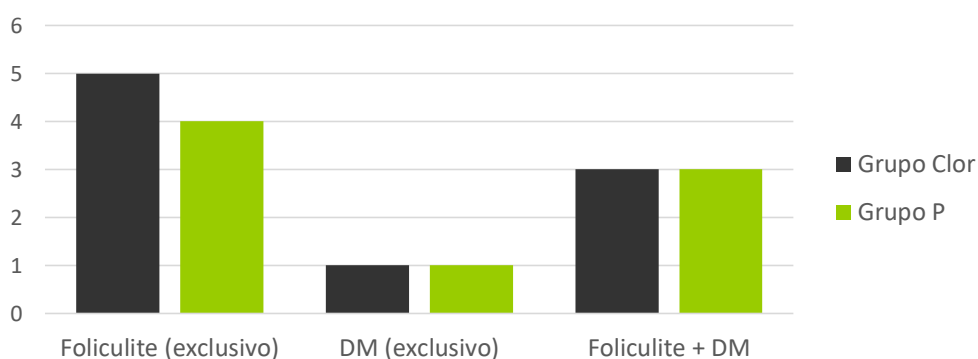
As infeções recorrentes constituíram 68,4% (13/19) dos casos e foram, por conseguinte, as mais frequentes, representadas por 80% (8/10) dos doentes no grupo Clor e 55,6% (5/9) dos doentes no grupo P (Figura 14).

Figura 14 – Distribuição dos doentes por grupo de tratamento consoante o caráter inicial ou recorrente da infeção (N=19).



A foliculite bacteriana superficial foi o tipo de infeção cutânea – e o tipo de piodermite – mais frequente, observada em 78,9% (15/19) dos doentes incluídos. Destes, 40% (6/15) revelaram também algum grau de sobrecrecimento de leveduras: três tinham infeção predominantemente bacteriana; três tinham infeção predominantemente fúngica, embora com diferentes graus de envolvimento bacteriano; e em todos os casos considerou-se a existência concomitante de foliculite bacteriana e dermatite por *Malassezia* (Figura 15). A dermatite por *Malassezia* foi o segundo tipo de infeção mais prevalente, tendo sido observada em 42,1% (8/19) dos doentes. Em 75% (6/8) destes doentes observou-se infeção bacteriana concomitante (Figura 15). Não foi observado qualquer envolvimento bacteriano na citologia dos outros dois doentes, exceto escassos bastonetes extracelulares sem qualquer significado clínico (Anexos 9 e 10).

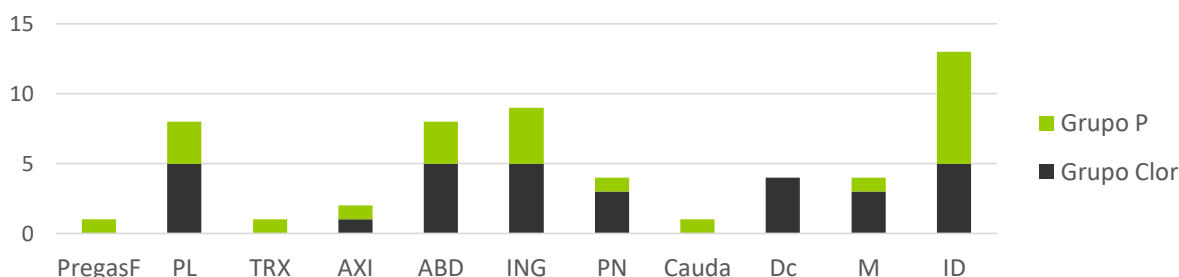
Figura 15 – Distribuição dos doentes com foliculite bacteriana e dermatite por *Malassezia* (DM) de acordo com o grupo de tratamento.



Cada um dos restantes tipos de infeção observados registou uma prevalência de 5,3% (1/19): um caso de piodermite mucocutânea associada a foliculite e dermatite por *Malassezia*, contabilizado nas descrições prévias e incluído no grupo Clor; um caso de impetigo incluído no grupo Clor; e um caso de *hot spot* incluído no grupo P (Anexo 9).

Globalmente, as regiões corporais mais comumente afetadas foram a região interdigital (ID) e a região inguinal (ING), respetivamente representadas por 68,4% (13/19) e 47,4% (9/19) dos doentes, seguidas pela região abdominal (ABD) e pela região perilabial (PL), ambas observadas em 42,1% (8/19) dos doentes. Todas estas regiões estiveram representadas de igual forma no grupo Clor por 50% (5/10) dos doentes. No grupo P, as regiões mais comumente afetadas foram a ID, representada por 88,9% (8/9) dos doentes e a ING, representada por 44,4% (4/9) dos doentes (Figura 16).

Figura 16 – Visão global da distribuição das regiões corporais afetadas na amostra (N=19) e por grupo de tratamento.



ABD – abdominal; AXI – axilar; Dc – dorso caudal; ID – interdigital; ING – inguinal; M – membro(s); PL – perilabial; PN – perineal; PregasF – pregas faciais; TRX – tórax.

As combinações de regiões mais frequentes em toda a amostra foram as seguintes: ABD+ING, observada em 42,1% (8/19) dos doentes; ING+ID, em 31,6% (6/19); ABD+ING+ID e PL+ID, cada uma observada em 26,3% (5/19) dos doentes; e PL+ING, registada em 21,1% (4/19) dos doentes (Anexo 9). Nos doentes com foliculite bacteriana – incluindo aqueles com infeção simultânea por leveduras – as regiões ID e PL foram aquelas mais frequentemente afetadas, respetivamente representadas por 73,3% (11/15) e 46,7% (7/15) dos doentes, seguidas pelas regiões ABD e ING, ambas representadas por 40% (6/15) dos doentes. Nos doentes com dermatite por *Malassezia* – incluindo aqueles com concomitante foliculite bacteriana – as regiões PL e ID foram as regiões afetadas com maior frequência, ambas representadas por 62,5% (5/8) dos doentes (Tabela 8).

Tabela 8 – N.º de ocorrências (frequência relativa, %) das regiões corporais afetadas nos doentes com foliculite e naqueles com dermatite por *Malassezia* (DM).

	PregasF	PL	TRX	AXI	ABD	ING	PN	Dc	M	ID
Foliculite (N=15)	1 (6,7)	7 (46,7)	1 (6,7)	2 (13,4)	6 (40,0)	6 (40,0)	3 (20,0)	3 (20,0)	4 (26,7)	11 (73,3)
DM (N=8)	1 (12,5)	5 (62,5)	1 (12,5)	1 (12,5)	2 (25,0)	3 (37,5)	1 (12,5)	1 (12,5)	1 (12,5)	5 (62,5)

ABD – abdominal; AXI – axilar; Dc – dorso caudal; ID – interdigital; ING – inguinal; M – membro(s); PL – perilabial; PN – perineal; PregasF – pregas faciais; TRX – tórax.

Cerca de 94,7% dos doentes apresentaram eritema, designadamente 93,3% dos doentes com foliculite e 100% dos doentes com dermatite por *Malassezia* (Tabela 9). A seguir ao eritema, as lesões crostosas e as lesões alopécicas foram as mais frequentes, observadas em 47,4% dos doentes com infeção cutânea, 50% daqueles com dermatite por *Malassezia* e, respetivamente, 53,3% e 46,7% dos doentes com foliculite. Todos os doentes com dermatite por *Malassezia* e crostas tinham foliculite bacteriana. As lesões papulares e pustulosas foram mais comuns nos doentes com foliculite, ambas observadas em 26,7% desses doentes (Tabela 9).

Tabela 9 – N.º de ocorrências (frequência relativa, %) das diferentes lesões cutâneas na globalidade da amostra (N=19) e, particularmente, nos doentes com foliculite e naqueles com dermatite por *Malassezia* (DM) – não incluído o registo das lesões com apenas uma ocorrência no total da amostra.

	pap	pust	col	cros	seb	erit	alo	ero	hiperp	liq
Foliculite	4	4	2	8	3	14	7	1	4	1
(N=15)	(26,7)	(26,7)	(13,3)	(53,3)	(20,0)	(93,3)	(46,7)	(6,7)	(26,7)	(6,7)
Foliculite em	3	3	1	4	3	8	4	1	2	0
exclusivo (N=9)	(33,3)	(33,3)	(11,1)	(44,4)	(33,3)	(88,9)	(44,4)	(11,1)	(22,2)	(0)
DM	2	1	1	4	0	8	4	0	2	2
(N=8)	(25,0)	(12,5)	(12,5)	(50,0)	(0)	(100)	(50,0)	(0)	(25,0)	(25,0)
DM em	1	0	0	0	0	2	1	0	0	1
exclusivo (N=2)	(50,0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(100)	(50,0)	(0)	(0)	(50,0)
Amostra total	5	5	3	9	3	18	9	2	4	2
(N=19)	(26,3)	(26,3)	(15,8)	(47,4)	(15,8)	(94,7)	(47,4)	(10,5)	(21,1)	(10,5)

Alo – alopecia; col – colaretes; cros – crostas; erit – eritema; ero – erosões; hiperp – hiperpigmentação; liq – liquenificação; pap – pápulas; pust – pústulas; seb – seborreia.

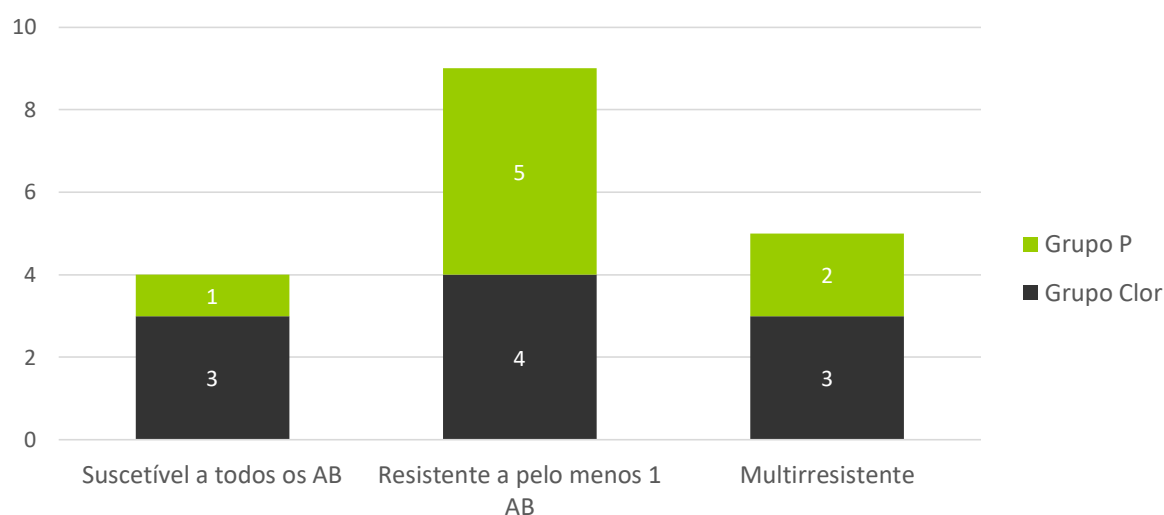
3.2. CULTURA BACTERIANA E TESTE DE SUSCETIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS

Das 14 amostras enviadas para bacteriologia, 7 pertenciam a doentes do grupo Clor e 7 a doentes do grupo P (Anexos 10 e 11). No grupo Clor isolou-se *S. pseudintermedius* em 4 amostras, *E. coli* numa amostra e *Staphylococcus* sp. nas restantes 2 amostras. No grupo P isolou-se *S. pseudintermedius* em 3 amostras e *Staphylococcus* sp. noutras 3. A amostra remanescente não apresentou crescimento bacteriano em meio aeróbio.

As doentes n.ºs 11 e 17 tinham um diagnóstico inicial de dermatite por *Malassezia* e o conhecimento da componente bacteriana foi apenas adquirido após a 1.ª consulta, com o exame citológico mais detalhado. Sem componente bacteriana não havia justificação para a realização de cultura. O mesmo aplicou-se à doente n.º 10, cuja citologia revelou uma infeção massiva por leveduras. No caso da doente n.º 8, que tinha também uma infeção exuberante por leveduras, observaram-se alguns bastonetes durante a consulta, pelo que se recolheu amostra para cultura.

Das estirpes isoladas, cerca de 69,2% (9/13) eram resistentes a pelo menos um dos antibióticos testados (Figura 17). Destas, 55,6% (5/9) eram multirresistentes, o que no total de isolados reflete uma prevalência de 38,5% (5/13). Se considerados apenas os isolados estafilocócicos, 66,7% (8/12) eram resistentes a pelo menos um antibiótico e, desses, 62,5% (5/8) eram multirresistentes, i.e. 41,7% da amostra (5/12). As estirpes suscetíveis a todos os antibióticos testados representaram 30,8% (4/13) da amostra; 33,3% (4/12) no caso dos estafilococos. Por esta análise geral dos perfis de suscetibilidade, verifica-se que, em relação a esse aspeto, a distribuição das estirpes isoladas pelos grupos de tratamento não foi totalmente equitativa, mas ainda assim foi sensivelmente semelhante (Figura 17).

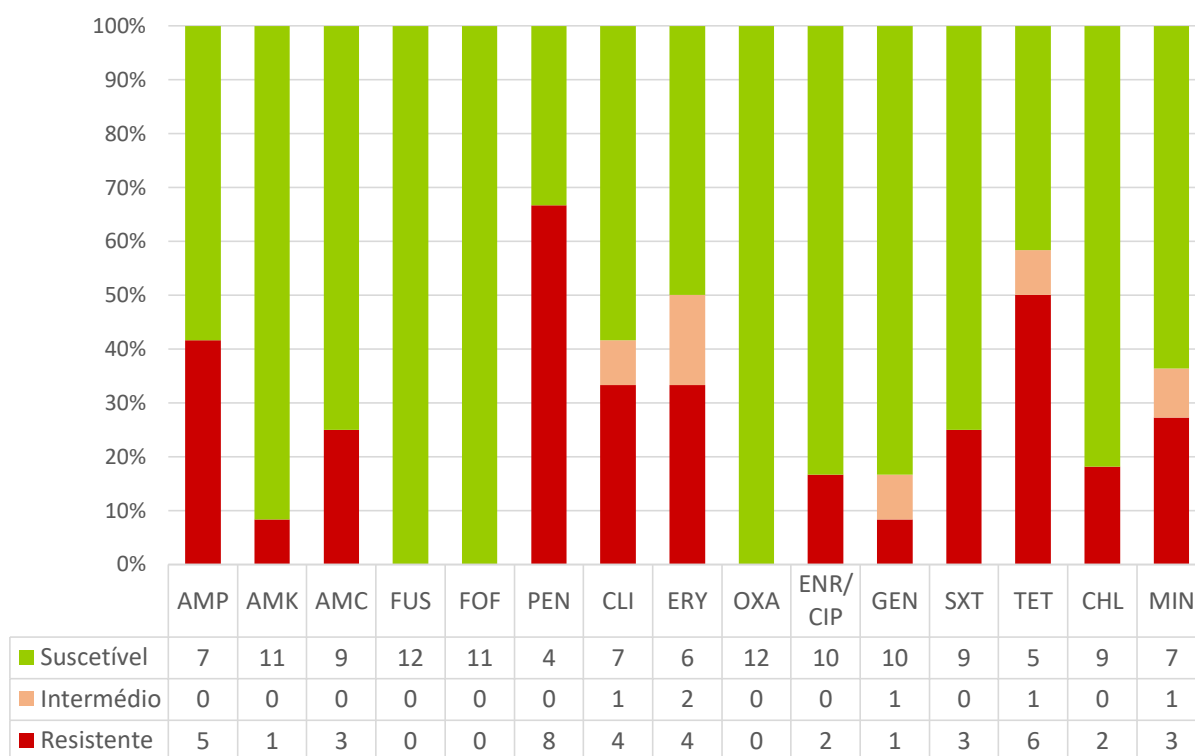
Figura 17 – Distribuição dos isolados bacterianos (N=13) por grupo de tratamento de acordo com o seu perfil de suscetibilidade a antibióticos.



Os isolados com suscetibilidade “intermédia” foram considerados como suscetíveis; um perfil multirresistente traduz as estirpes resistentes a pelo menos três antibióticos (AB) de grupos diferentes.

O painel de antibióticos variou ligeiramente para algumas estirpes, o que porém não impede a apreciação global do perfil de suscetibilidade dos estafilococos isolados. Há alguns pontos principais que sobressaem ao analisar a Figura 18: todas as estirpes foram suscetíveis ao ácido fusídico (N=12), à oxacilina (N=12) e à fosfomicina (N=11); as frequências mais elevadas de estirpes resistentes verificaram-se para a penicilina, tetraciclina e ampicilina, respetivamente, 66,7% (8/12), 50% (6/12) e 41,7% (5/12), seguidas pela eritromicina e pela clindamicina, ambas com uma frequência de estirpes resistentes de 33,3% (4/12); 25% (3/12) das estirpes foram resistentes à amoxicilina e ácido clavulânico e ao representante das sulfonamidas potenciadas; 27,3% (3/11) das estirpes avaliadas para a minociclina mostraram resistência; e, dos antibióticos para os quais se observaram algumas estirpes resistentes, os aminoglicosídeos, o cloranfenicol e as quinolonas foram os que registaram, ainda assim, menos resistências.

Figura 18 – Visão global da suscetibilidade a antibióticos dos isolados estafilocócicos obtidos (N=12).



AMC – amoxicilina/ácido clavulânico; AMK – amicacina; AMP – ampicilina; CHL – cloranfenicol; CIP – ciprofloxacina; CLI – clindamicina; ENR – enrofloxacina; ERY – eritromicina; FOF – fosfomicina; FUS – ácido fusídico; GEN – gentamicina; MIN – minociclina; OXA – oxacilina; PEN – penicilina; SXT – trimetoprim/sulfametoxazol; TET – tetraciclina.

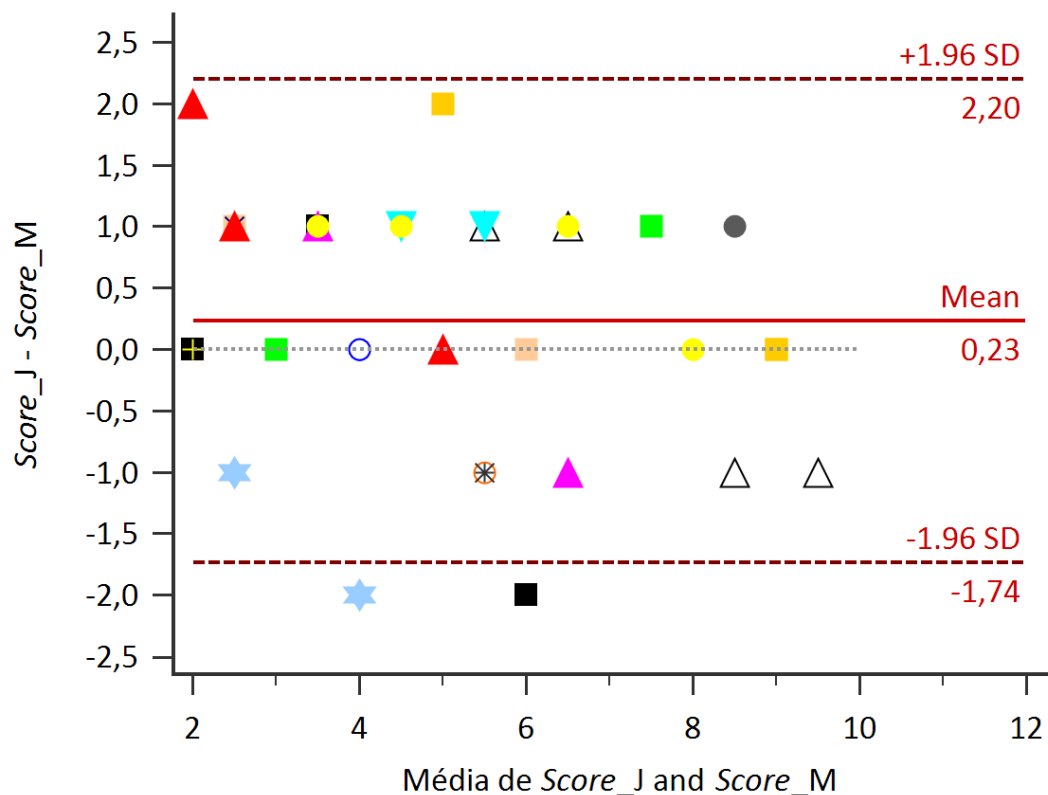
3.3. AVALIAÇÃO DOS INDICADORES PRIMÁRIOS

3.3.1. Verificação de concordância entre as observadoras

Todos os *scores* clínicos atribuídos pela estagiária foram agrupados sob a designação *Score_J* e aqueles atribuídos pela orientadora sob a designação *Score_M*. Nesta análise foram incluídos todos os 35 pares de observações – atribuições de *score* – disponíveis; a maior parte traduzia múltiplas observações dos mesmos doentes em diferentes ocasiões no decorrer do tratamento (Anexo 12). A análise foi efetuada por três vias diferentes. Primeiro, admitiu-se que os 35 pares eram independentes entre si, como se fossem de 35 doentes diferentes. Segundo essa linha de análise, a diferença média entre as medições das duas observadoras – i.e., o viés estimado entre ambas – foi de, aproximadamente, $0,23 \pm 1,003$ (IC_{95%} para a média: [-0,116; 0,573]). Para esta estimativa espera-se que, aproximadamente, 95% das diferenças de medições futuras relativas a indivíduos semelhantes se situem entre -1,74 (IC_{95%}: [-2,331; -1,142]) e 2,19 (IC_{95%}: [1,599; 2,788]), respetivamente, limites inferior e superior de concordância. As outras duas abordagens tiveram em conta o n.º real de 16 doentes, embora de maneira distinta. Uma consistiu em fazer a média das medições da mesma observadora para cada doente e só depois avaliar a diferença

e a média relativa aos *scores* de cada par. O viés assim estimado foi de, sensivelmente, $0,16 \pm 0,787$ (IC_{95%}: [-0,263; 0,576]), com limites de concordância de -1,39 (IC_{95%}: [-2,120; -0,654]) a 1,70 (IC_{95%}: [0,967; 2,432]). A outra teve em conta a existência de medições repetidas de valores reais inconstantes (Figura 19).

Figura 19 – Gráfico Bland-Altman para investigar a concordância entre as observadoras, considerando medições repetidas: diferença entre as medições de *score* clínico de ambas vs. a média dessas medições.



Cada símbolo (forma e cor) representa um doente (há símbolos repetidos e alguns estão sobrepostos). *Score_J* – estagiária; *Score_M* – orientadora; *SD* – *standard deviation*, desvio padrão (s).

O viés assim estimado e os respetivos limites de concordância foram praticamente idênticos aos da 1.^a análise, que ignorava a dependência real de alguns dados. Houve só pequenas variações a partir da 3.^a casa decimal nos valores do desvio padrão e, por isso, dos limites de concordância, que formam um intervalo ligeiramente mais estreito na 1.^a análise, mas cuja diferença para esta última análise é, mesmo assim, irrisória. Segundo o teste de Wilcoxon, o viés não aparenta ser estatisticamente significativo ($p=0,1965$).

3.3.2. Scores clínicos e citológicos antes do início do tratamento

Consideram-se aqui todos os 18 doentes incluídos, num total de 19 casos de infeção (N=19). Os *scores* clínicos e citológicos atribuídos, em T0, a cada doente encontram-se especificados, respetivamente, nos Anexos 13 e 14, juntamente com os *scores* atribuídos no decorrer do ensaio clínico.

Tabela 10 – Análise do *score* clínico e do *score* citológico na amostra total (N=19) e por grupo de tratamento (grupo Clor, n=10; grupo P, n=9), em T0.

	Score clínico						Score citológico					
	<i>M</i>	<i>s</i>	<i>Mdn</i>	<i>IQR</i>	mín	máx	<i>M</i>	<i>s</i>	<i>Mdn</i>	<i>IQR</i>	mín	máx
Total	5,47	2,52	5,00	5,00	2	9	3,95	1,99	3,00	2,00	1	9
Clor	6,00	2,31	5,50	3,25	3	9	4,40	2,22	4,00	2,75	2	9
P	4,89	2,76	4,00	5,00	2	9	3,44	1,67	3,00	1,00	1	7

IQR – *interquartile range*, amplitude interquartil; *M* – média; máx. – máximo; *Mdn* – mediana; mín. – mínimo; *s* – desvio padrão.

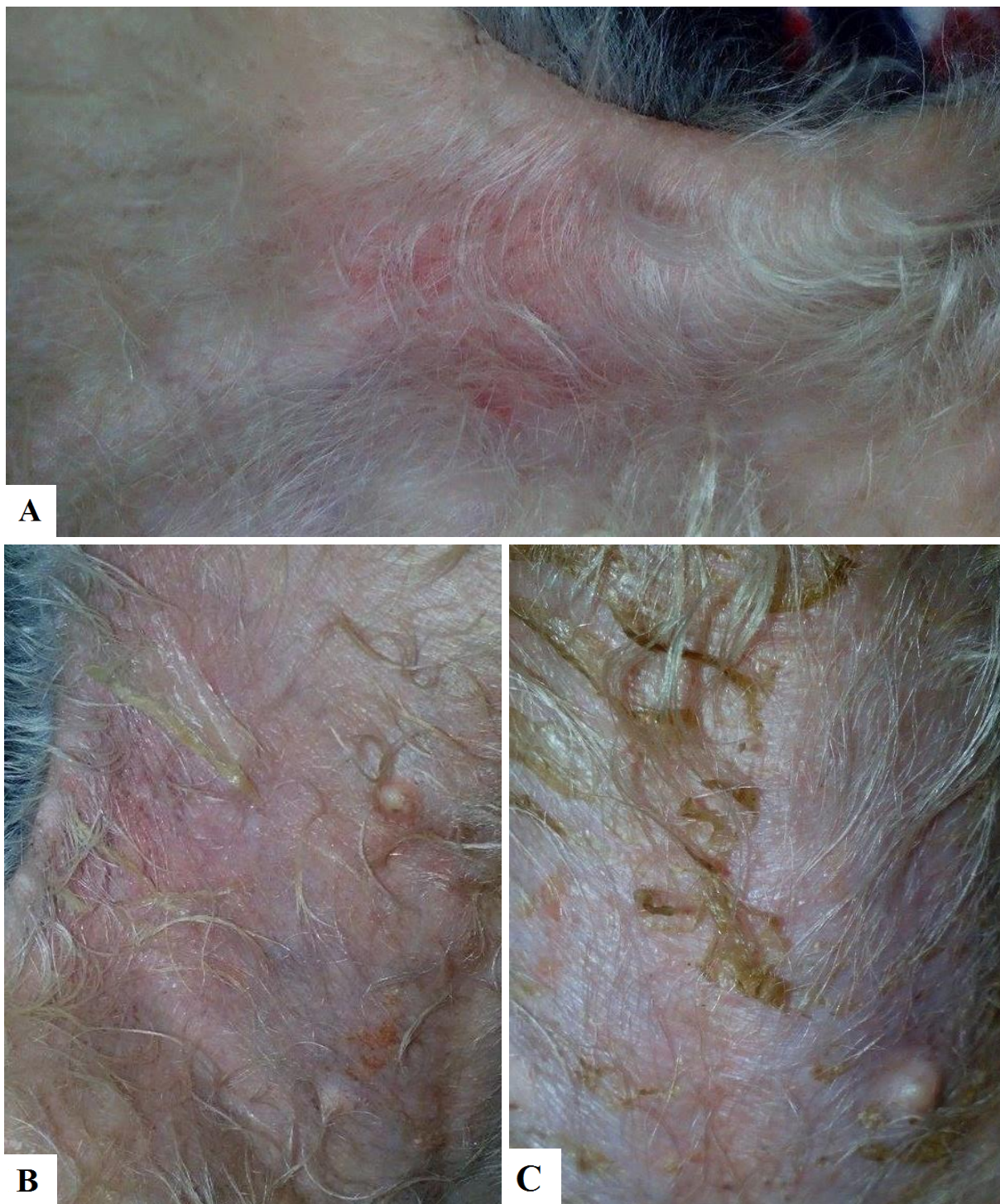
O *score* clínico médio dos doentes no grupo Clor aquando do início do tratamento, ou seja, no momento de inclusão no projeto, foi de $6,0 \pm 2,31$, mas o *score* individual variou entre 3 (valor mínimo atribuído) e 9 (valor máximo) (Tabela 10). No grupo P, o *score* clínico médio em T0 foi de, sensivelmente, $4,9 \pm 2,76$, tendo o *score* individual variado entre 2 e 9.

Quanto ao *score* citológico, a média no grupo Clor foi de $4,4 \pm 2,22$, variando o *score* individual entre 2 e 9. No grupo P, o *score* citológico médio à data de inclusão foi de, aproximadamente, $3,4 \pm 1,67$, tendo o *score* individual variado entre 1 e 7. O teste-*U* de Mann-Whitney indicou não haver diferença estatística significativa entre os grupos quanto ao *score* clínico ($p=0,2296$) e citológico ($p=0,4534$) antes do início do tratamento.

3.3.3. Dropouts

Globalmente, a taxa de *dropouts* foi de 42% (8/19). No grupo Clor, apenas 60% dos doentes completaram o tratamento (6/10); no grupo P, somente 55,6% (5/9). Os motivos para *dropout* no grupo Clor incluíram violação dos critérios de elegibilidade (doente n.º 1), suspeita de reação adversa (doente n.º 10; Figura 20) e perda de seguimento (doente n.º 17 e doente n.º 18). No grupo P, os motivos que levaram a *dropout* foram escolha voluntária da pessoa responsável (doente n.º 3), perda de seguimento (doente n.º 7), resposta nula ao tratamento (doente n.º 8) e violação do protocolo (doente n.º 16).

Figura 20 – Suspeita de reação adversa à clorexidina na doente n.º 10, com eritema moderado a intenso e descamação em placas; prurido muito intenso associado (fotografias gentilmente cedidas pela colega Susana Silva).



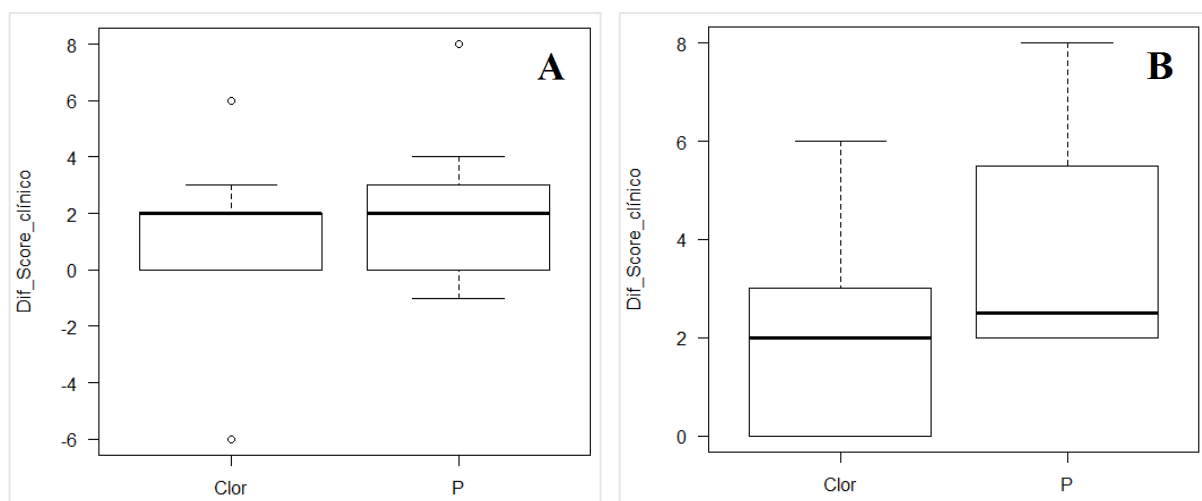
A – região abdominal e inguinal direita aos 10 dias de tratamento (tx); B – mesma região aos 14 dias de tx; suspensão do biocida. C – região abdominal esquerda; 1 dia depois.

3.3.4. Progressão clínica

Para a análise ITT (Figura 21, A) foram utilizados os dados de todos os doentes incluídos neste ensaio clínico, num total de 19 unidades experimentais. Apenas 8 doentes puderam ser incluídos na análise PP (Figura 21, B) respeitante ao período T0-T3: 5 doentes do grupo Clor e 3 do grupo

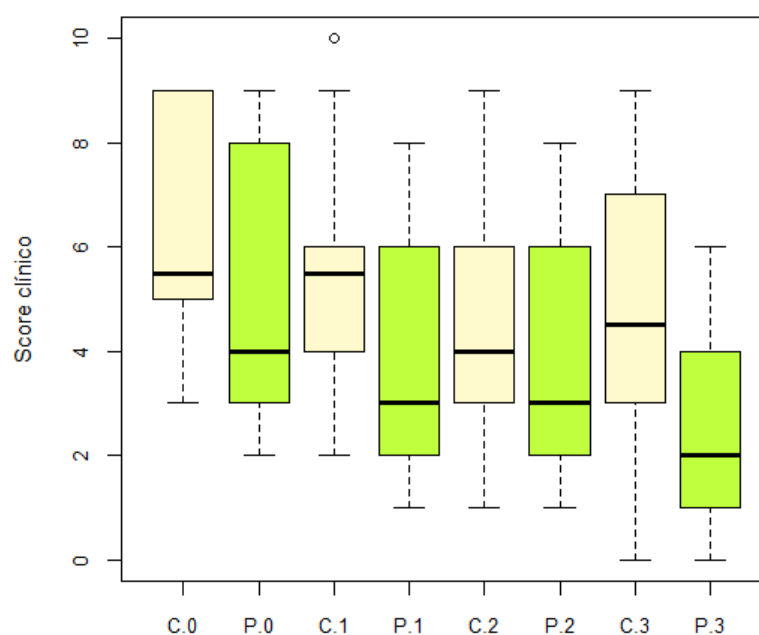
P. Segundo o teste-*U* de Mann-Whitney, não houve diferença estatística significativa entre os grupos de tratamento quanto às diferenças de *score* clínico entre T0 e T3, quer para a análise ITT ($p=0,733$), quer para a análise PP ($p=0,3191$). A evolução do *score* clínico entre T0 e T3 para ambos os grupos está representada na Figura 22 e traduz os registos obtidos segundo a análise ITT.

Figura 21 – Diagramas de extremos e quartis: diferenças de *score* clínico entre T0 e T3 consoante os grupos de tratamento.



A – análise ITT (amostra total, N=19; grupo Clor, n=10; grupo P, n=9). B – análise PP (amostra total, N=8; grupo Clor, n=5; grupo P, n=3).

Figura 22 – Diagramas de extremos e quartis: progressão do *score* clínico de T0 a T3 (T0, T1, T2, T3) consoante os grupos de tratamento.

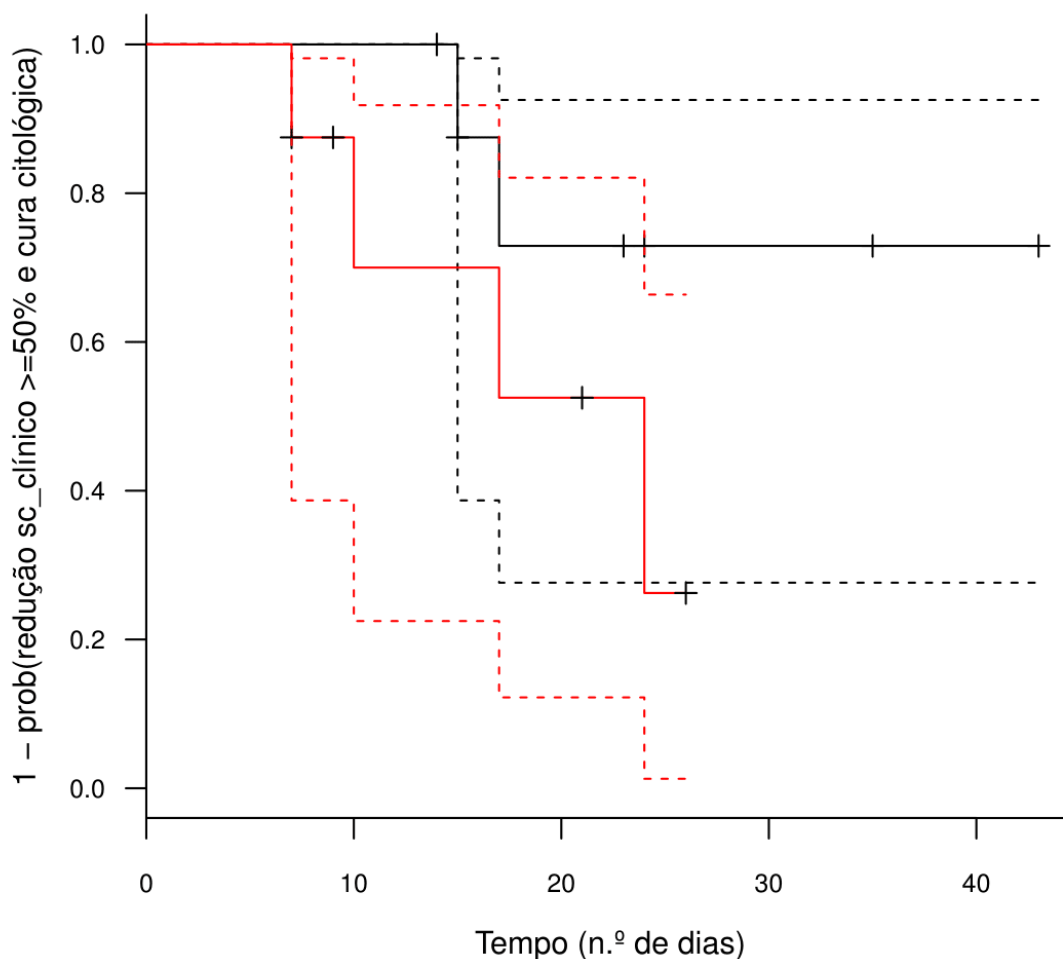


Diagramas a bege – grupo Clor; diagramas a verde – grupo P; gráfico elaborado com os registos da análise ITT (amostra total, N=19; grupo Clor, n=10; grupo P, n=9).

O método de Kaplan-Meier foi utilizado para estimar a distribuição do tempo até à redução de pelo menos 50% do *score* clínico e simultânea resolução citológica da infeção (Figura 23). No grupo Clor, 20% dos doentes mostraram uma redução de pelo menos 50% do *score* clínico com cura citológica entre os dias 15 e 17 do tratamento. No grupo P, 50% dos doentes mostraram esse progresso entre os dias 7 e 24 do tratamento; 37,5% até ao dia 17. Segundo o teste *Log-rank* não houve diferença estatística significativa entre as curvas de sobrevivência ($p=0,147$), o que seria de esperar considerando a sobreposição dos intervalos de confiança de 95%.

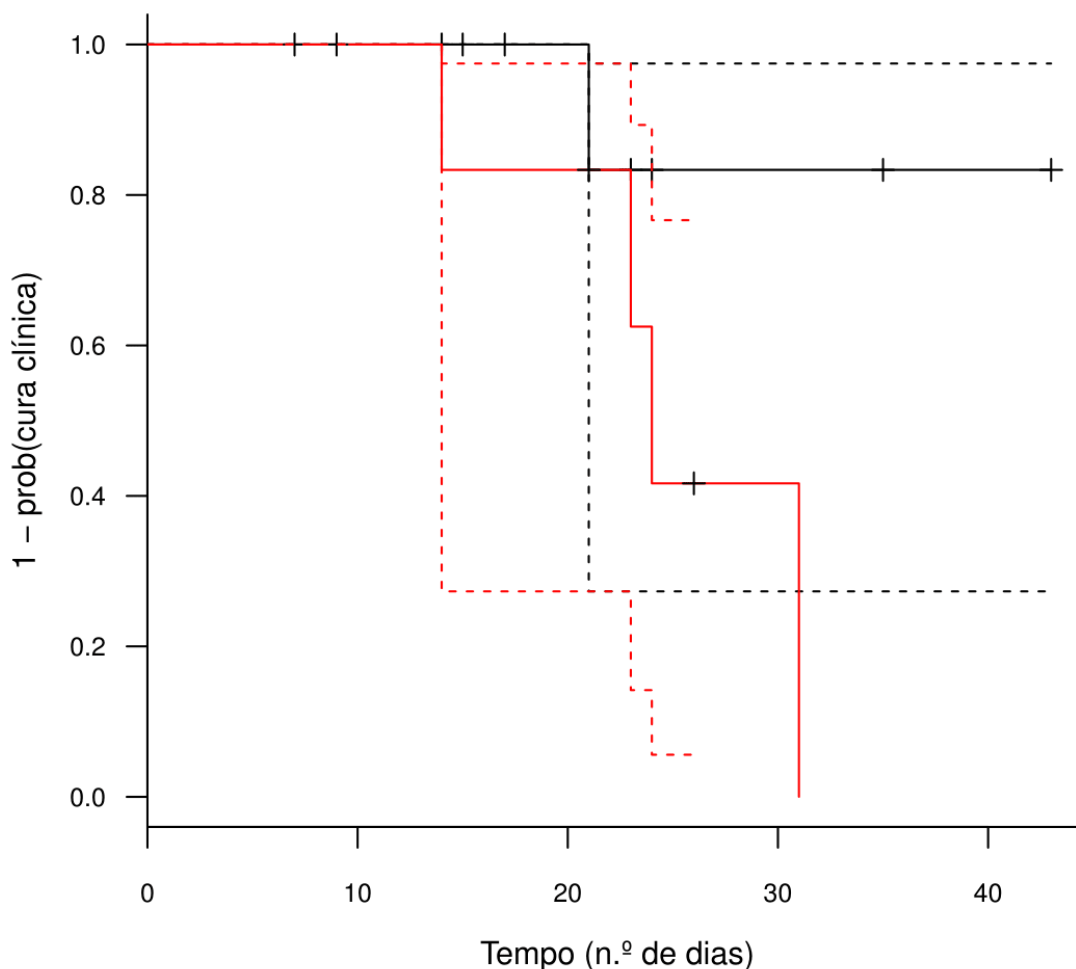
A distribuição do tempo até à cura clínica foi também analisada (Figura 24). No grupo Clor, apenas um doente atingiu a cura clínica – observada aos 21 dias de tratamento – representando 10% desse grupo de doentes. No grupo P, 50% dos doentes alcançaram a cura clínica, dos quais 75% entre os dias 14 e 24 do tratamento. O teste *Log-rank* mostrou não haver uma diferença estatística significativa entre as duas curvas ($p=0,0842$) e, tal como anteriormente, verifica-se uma sobreposição dos intervalos de confiança de 95%.

Figura 23 – Análise de sobrevivência de Kaplan-Meier para comparar o tempo até redução de pelo menos 50% do *score* clínico e concomitante resolução citológica da infeção.



Linhas a preto – grupo Clor; linhas a vermelho – grupo P; linhas a tracejado – IC95% da estimativa; + (sinal de mais) – caso censurado; há sobreposição de alguns + (amostra total, N=19; grupo Clor, n=10; grupo P, n=8).

Figura 24 – Análise de sobrevivência de Kaplan-Meier para comparar o tempo até cura clínica.

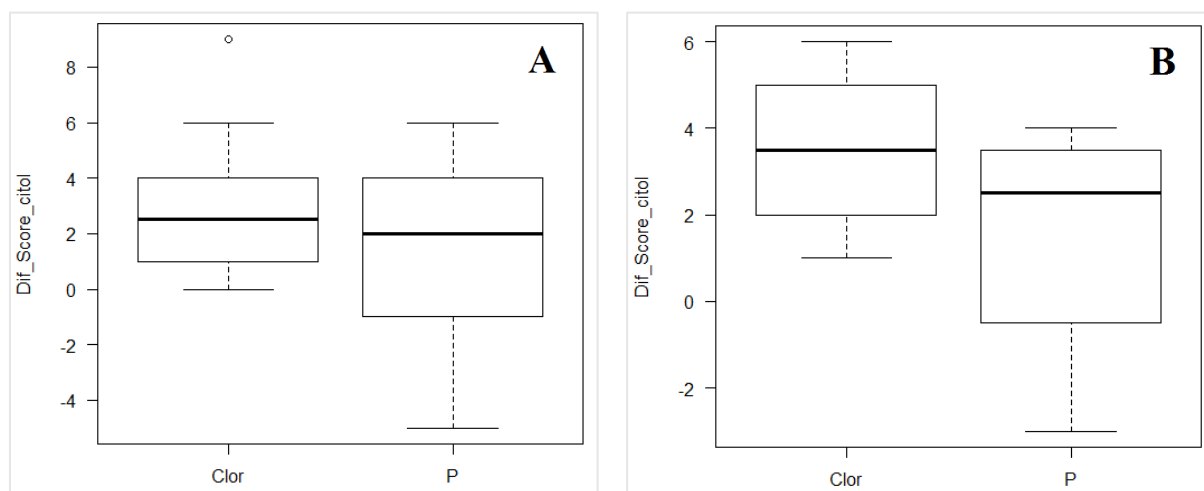


Linhas a preto – grupo Clor; linhas a vermelho – grupo P; linhas a tracejado – IC95% da estimativa; + (sinal de mais) – caso censurado; há sobreposição de alguns + (amostra total, N=19; grupo Clor, n=10; grupo P, n=8).

3.3.5. Progressão citológica

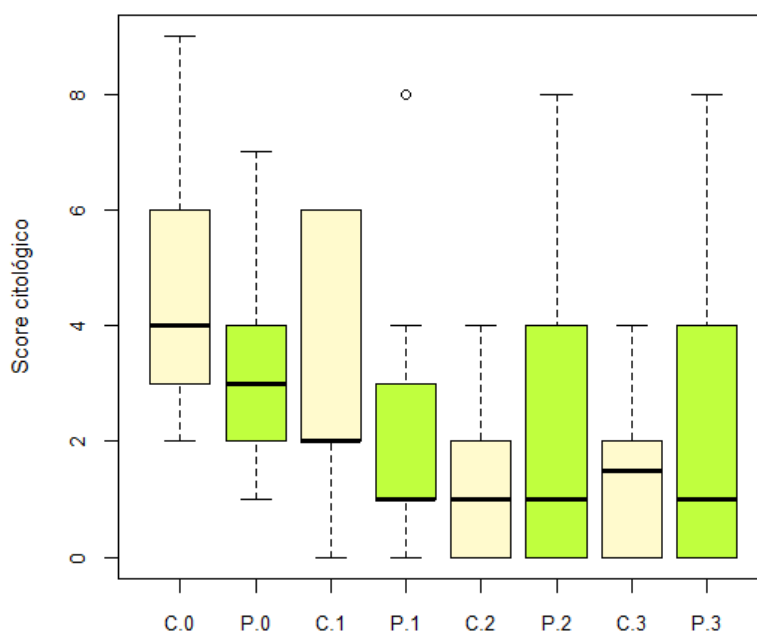
No caso dos doentes com mais do que uma amostra por consulta no registo do exame citológico, foi escolhido para análise o registo respeitante à região corporal mais afetada ou representativa – geralmente a mesma da amostra recolhida para cultura bacteriana. Em última instância, foi escolhida a região corporal para a qual havia um registo mais completo do *score* citológico ao longo do tempo. Os registos detalhados dos exames citológicos estão disponíveis no Anexo 15. Para a análise ITT relativa ao *score* citológico (Figura 25, A) foram utilizados os dados das 19 unidades experimentais. Para a análise PP (Figura 25, B) só puderam ser usados os registos de 8 doentes, nomeadamente 4 do grupo Clor e 4 do grupo P. Segundo o teste-*U* de Mann-Whitney, não houve diferença estatística significativa entre os grupos de tratamento quanto às diferenças de *score* citológico entre T0 e T3, quer para a análise ITT ($p=0,3881$), quer para a análise PP ($p=0,3807$). A evolução do *score* citológico entre T0 e T3 para ambos os grupos está exposta na Figura 26 e refere-se aos dados obtidos segundo a análise ITT.

Figura 25 – Diagramas de extremos e quartis: diferenças de *score* citológico entre T0 e T3 consoante os grupos de tratamento.



A – análise ITT (amostra total, N=19; grupo Clor, n=10; grupo P, n=9). B – análise PP (amostra total, N=8; grupo Clor, n=4; grupo P, n=4).

Figura 26 – Diagramas de extremos e quartis: progressão do *score* citológico de T0 a T3 (T0, T1, T2, T3) consoante os grupos de tratamento.

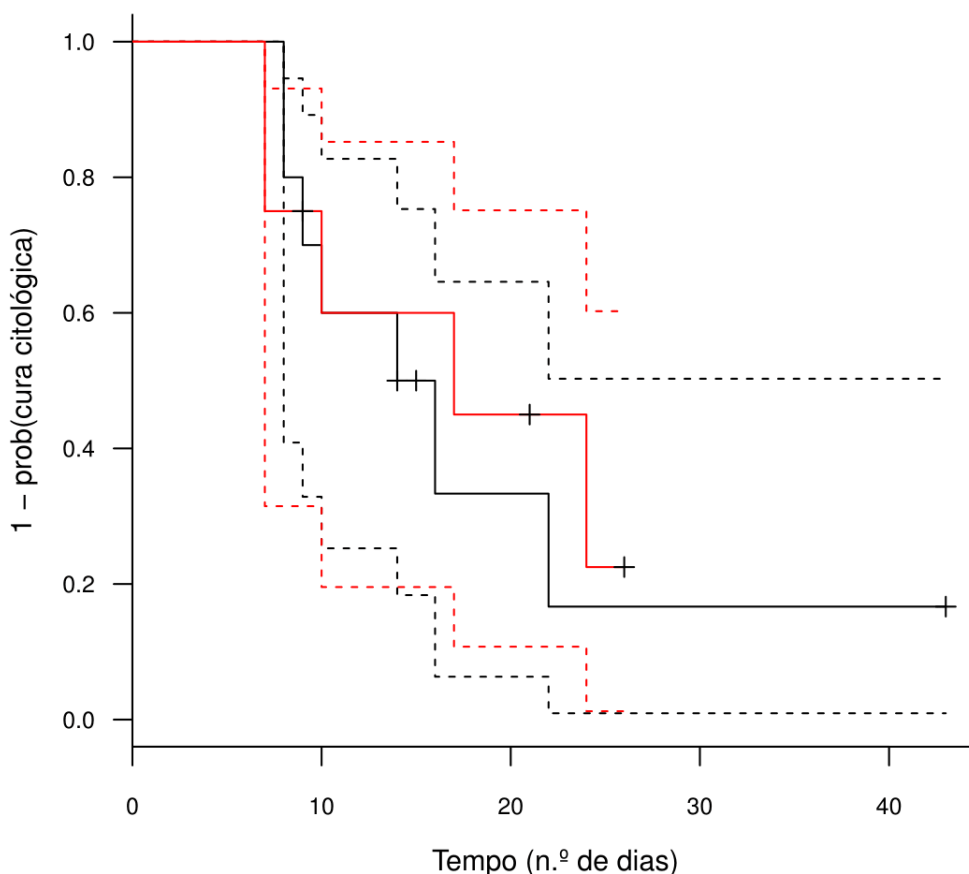


Diagramas a bege – grupo Clor; diagramas a verde – grupo P; gráfico elaborado com os registos da análise ITT (amostra total, N=19; grupo Clor, n=10; grupo P, n=9).

Foi novamente usado o método de Kaplan-Meier para estimar a distribuição do tempo até cura citológica (Figura 27), observada em 70% dos doentes no grupo Clor e 62,5% dos doentes no grupo P. O tempo mediano até se observar cura citológica foi de 14 dias no grupo Clor, variando entre 8 e 22 dias, enquanto no grupo P foi de 17 dias, variando entre 7 e 24 dias. De acordo com o teste *Log-rank* também não houve diferença estatística significativa entre estas duas curvas de sobrevivência ($p=0,672$). Independentemente dos resultados das análises ITT e PP para a

evolução do *score* citológico entre T0 e T3 e da análise de sobrevivência Kaplan-Meier e excluindo a doente n. 7, a análise dos restantes 18 casos permite constatar que globalmente se observou uma melhoria citológica com relevância clínica em 70% dos doentes do grupo Clor (7/10) e 75% dos doentes do grupo P (6/8) (Anexos 14 e 15). Esta melhoria refere-se não só à diminuição do n.º de microrganismos, como também, no que respeita às bactérias, à alteração crucial da sua localização, nomeadamente à alteração de intracelular para extracelular.

Figura 27 – Análise de sobrevivência de Kaplan-Meier para comparar o tempo até cura citológica.



Linhas a preto – grupo Clor; linhas a vermelho – grupo P; linhas a tracejado – IC95% da estimativa; + (sinal de mais) – caso censurado (amostra total, N=19; grupo Clor, n=10; grupo P, n=8).

Nos dois únicos doentes com dermatite por *Malassezia* em exclusivo (doente n.º 8 e doente n.º 10, respetivamente, grupo P e grupo Clor), não se verificou qualquer melhoria citológica, havendo para a doente n.º 8 um agravamento quanto ao n.º de microrganismos e ao tipo de infeção, que passou de fúngica a mista. No caso da doente n.º 16 (grupo P) houve também um aparente agravamento da infeção no exame citológico. O doente n.º 13 (grupo Clor) não registou qualquer melhoria em termos globais e embora tenha havido uma aparente melhoria na citologia interdigital (Anexo 15), a mesma foi acompanhada por um sobrecrecimento de leveduras. Para além disso, o exame citológico manteve-se praticamente inalterado nas regiões

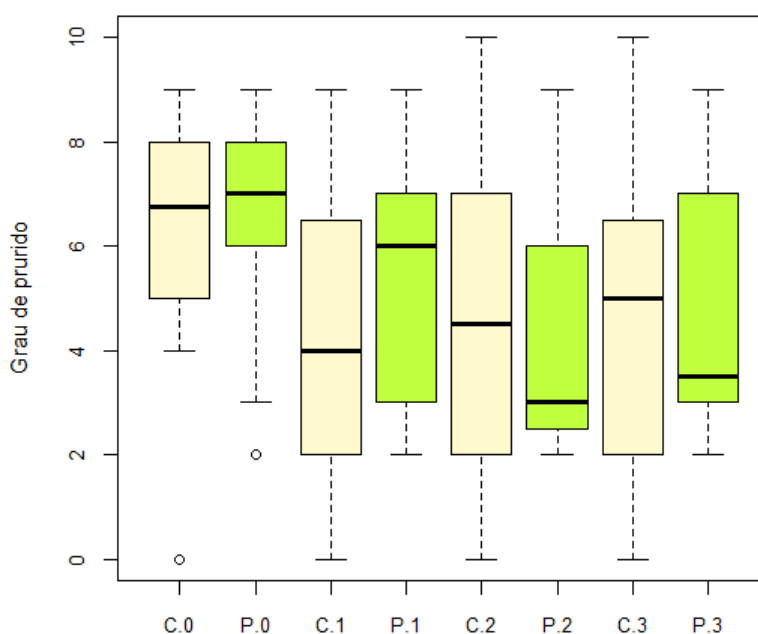
abdominal e inguinal. No caso da doente n.º 17 (grupo Clor) verificou-se uma melhoria ligeira na componente bacteriana, mas a componente fúngica manteve-se inalterada e quanto às lesões cutâneas também não se observou grande melhoria (Anexo 13). Nas doentes n.ºs 6 e 11a identificou-se uma infeção por leveduras após resolução da infeção bacteriana, como sucedeu com o doente n.º 13 e, curiosamente, para a mesma região, a região interdigital (Anexo 15).

3.4. AVALIAÇÃO DOS INDICADORES SECUNDÁRIOS

3.4.1. Grau de prurido

A evolução do grau de prurido individual está especificada no Anexo 16 e a evolução global do prurido em cada grupo, consoante a análise ITT, está representada na Figura 28.

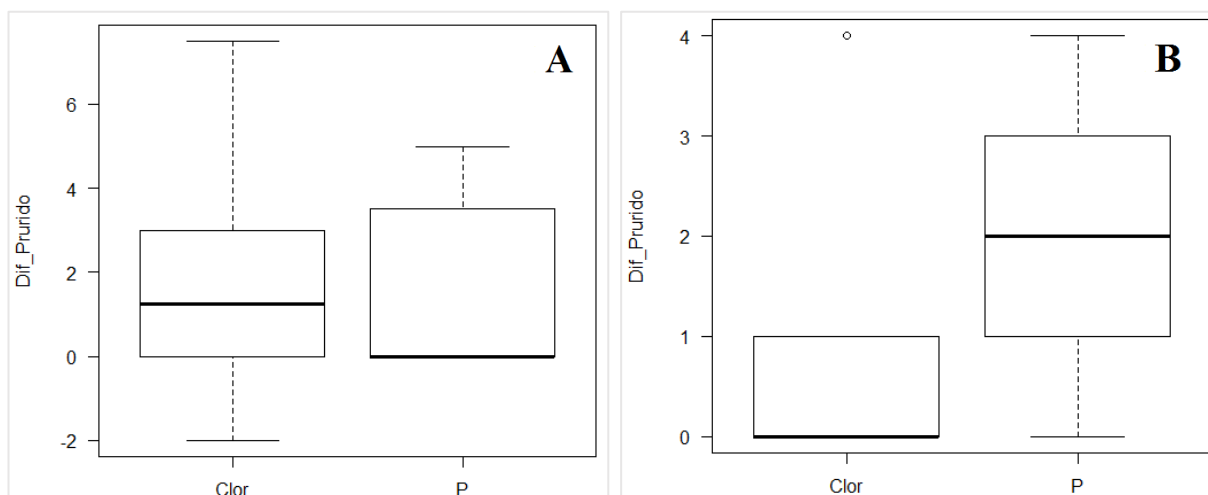
Figura 28 – Diagramas de extremos e quartis: progressão do grau de prurido de T0 a T3 (T0, T1, T2, T3) consoante os grupos de tratamento.



Diagramas a bege – grupo Clor; diagramas a verde – grupo P; gráfico elaborado com os registos da análise ITT (amostra total, N=19; grupo Clor, n=10; grupo P, n=9).

Para T0, o grau de prurido médio nos doentes do grupo Clor foi de $6,1 \pm 2,68$ (variando de 0 a 9), enquanto no grupo P foi de $6,4 \pm 2,46$ (variando de 2 a 9). O teste-*U* de Mann-Whitney mostrou não haver diferença estatística significativa entre os grupos relativamente ao grau de prurido em T0 ($p=0,7422$), como seria de esperar. Não se verificou igualmente qualquer diferença estatística significativa entre os grupos de tratamento quanto à diferença do grau de prurido entre T0 e T3, quer consoante a análise ITT ($p=0,9661$), quer consoante a análise PP ($p=0,424$) (Figura 29).

Figura 29 – Diagramas de extremos e quartis: diferenças do prurido entre T0 e T3 consoante os grupos de tratamento.



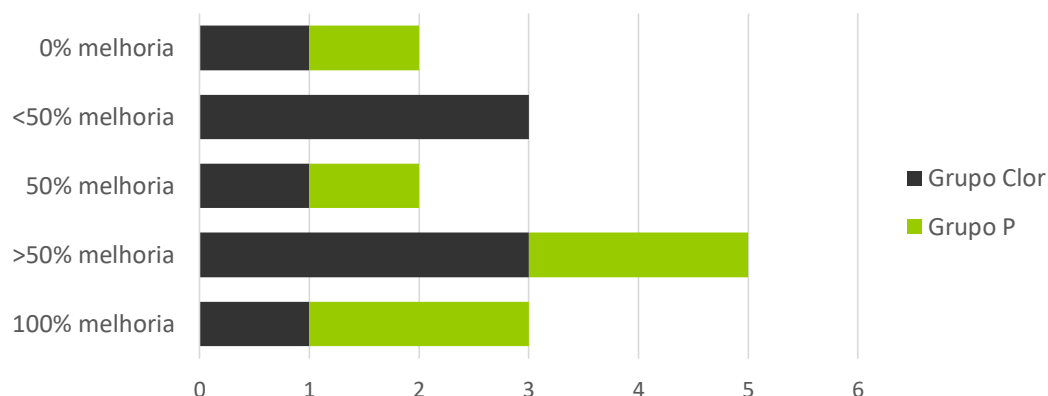
A – análise ITT (amostra total, N=19; grupo Clor, n=10; grupo P, n=9). B – análise PP (amostra total, N=8; grupo Clor, n=5; grupo P, n=3).

3.4.2. Questionários

Foram criados 16 questionários individuais relativos a 16 unidades experimentais (Anexo 5). Em falta ficaram 3 questionários, todos referentes a doentes do grupo P, dos quais dois devido a perda de contacto com os donos (doentes n.º 3 e n.º 8) e um devido à inexistência de registos subsequentes à consulta de inclusão no estudo (doente n.º 7). Não se obteve resposta para um dos questionários (doente n.º 1; grupo Clor).

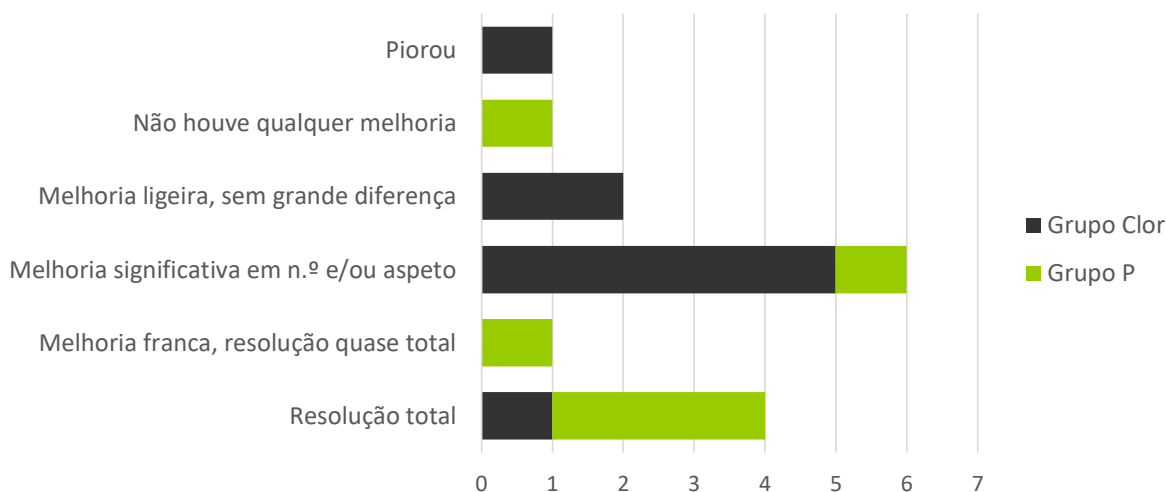
As avaliações quantitativas da melhoria clínica (Figura 30) foram tendencialmente coerentes com as avaliações qualitativas (Figura 31). As pequenas diferenças manifestaram-se sobretudo nas situações intermédias, entre os 50% e 100% de melhoria, nas quais a quantificação segundo as categorias propostas aparentou ser mais difícil. Em termos globais, cerca de 67% das pessoas notaram uma melhoria clínica de pelo menos 50% (10/15): 56% das pessoas no grupo Clor (5/9) e 83% das pessoas no grupo P (5/6).

Figura 30 – Avaliação quantitativa do grau de melhoria das lesões de pele no fim do tratamento em comparação ao dia zero (amostra total, N=15; grupo Clor, n=9; grupo P, n=6).



De acordo com a avaliação qualitativa (Figura 31), a maioria das pessoas notou realmente melhorias clínicas relevantes com o tratamento (11/15). A resolução total ou quase total das lesões foi mais notória para o grupo P.

Figura 31 – Avaliação qualitativa do grau de melhoria das lesões de pele no final do tratamento em comparação ao dia zero (amostra total, N=15; grupo Clor, n=9; grupo P, n=6).

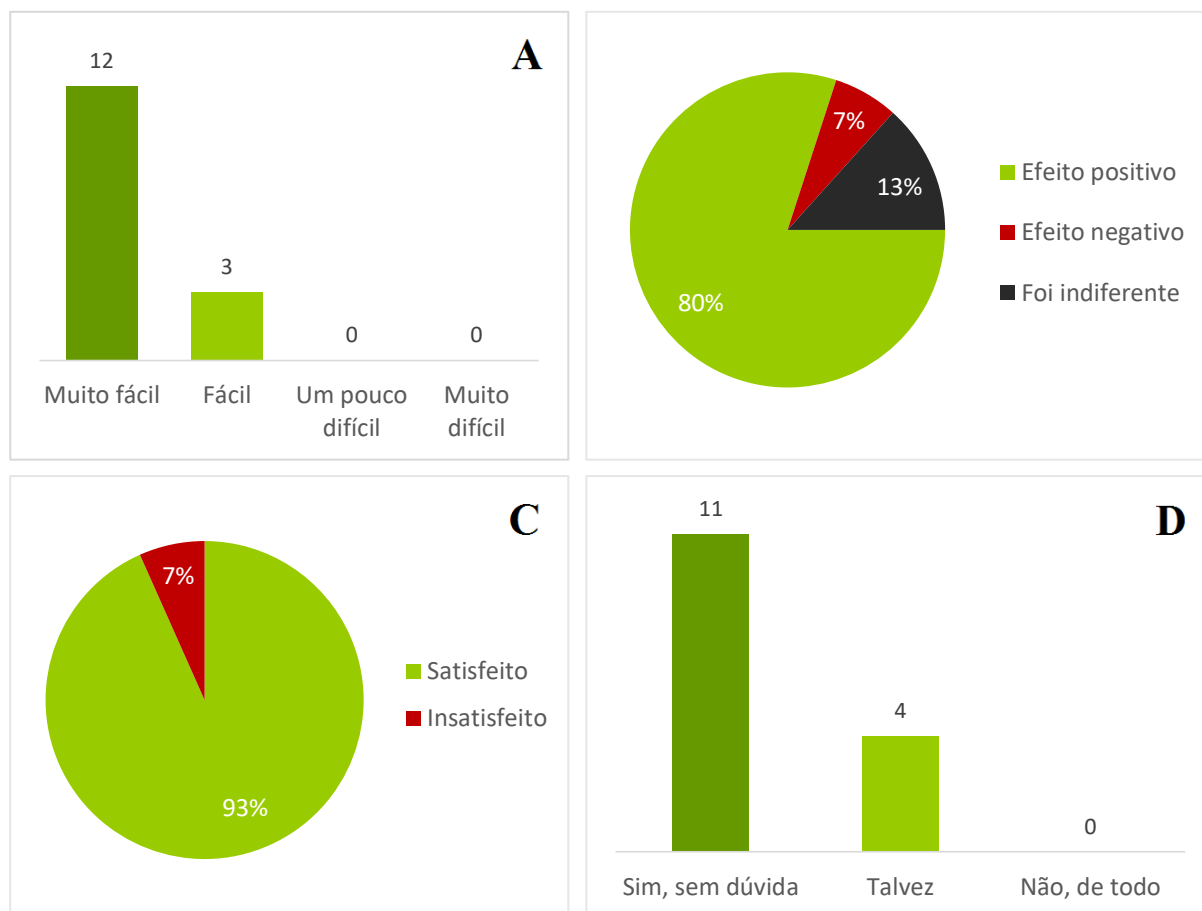


Embora não elegível para o questionário individual, a responsável pela doente n.º 7, com a qual se manteve contacto esporádico, preencheu o questionário geral (Anexo 6). A responsável pela doente n.º 11 preencheu este questionário só uma vez. Em suma, obtiveram-se 15 respostas, das quais 9 relacionadas com o grupo Clor e 6 com o grupo P.

O protocolo terapêutico foi bem aceite, pois a grande maioria dos participantes considerou o tratamento muito fácil de efetuar (Figura 32, A) e nenhum achou o produto de tratamento desagradável. Da mesma forma, a maior parte das pessoas considerou que o tratamento teve um efeito positivo na condição do doente (Figura 32, B), especificamente cerca de 78% (7/9) das pessoas no grupo Clor e 83% (5/6) daquelas no grupo P. Uma pessoa em cada grupo considerou que o tratamento não fez qualquer diferença para o doente, i.e. não melhorou nem piorou a situação. O efeito negativo observado traduz a suspeita de reação adversa (doente n.º 10) no grupo Clor.

Em termos globais, todos os participantes ficaram satisfeitos com a inclusão no projeto, mais uma vez excluindo a situação da doente n.º 10 (Figura 32, C). Nenhum dos participantes excluiu uma eventual futura participação noutro projeto de investigação a decorrer na FMV-ULisboa (Figura 32, D).

Figura 32 – Respostas dos participantes ao questionário geral (N=15).



A – quanto à facilidade de aplicação do tratamento; B – quanto ao efeito do tratamento na condição do doente; C – quanto à satisfação global com a entrada no projeto; D – quanto à possível participação futura em projetos de investigação na FMV-ULisboa.

4. DISCUSSÃO

4.1. VISÃO GLOBAL

Tanto quanto é do conhecimento da estagiária e da orientadora, este foi o primeiro ensaio clínico a avaliar a utilização da polihexanida no tratamento de infeções cutâneas de origem bacteriana ou por *Malassezia* no cão. Apesar do seu carácter preliminar e do tamanho reduzido da amostra em relação ao originalmente planeado, os resultados globais do projeto sugerem que a aplicação tópica do Prontosan® solução, uma vez por dia, durante uma a três semanas, é eficaz no tratamento de algumas piodermites, com ou sem sobrecrecimento associado de leveduras *Malassezia*, sendo este produto e protocolo muito bem tolerados pelos doentes.

4.2. ANÁLISE DE EFICÁCIA

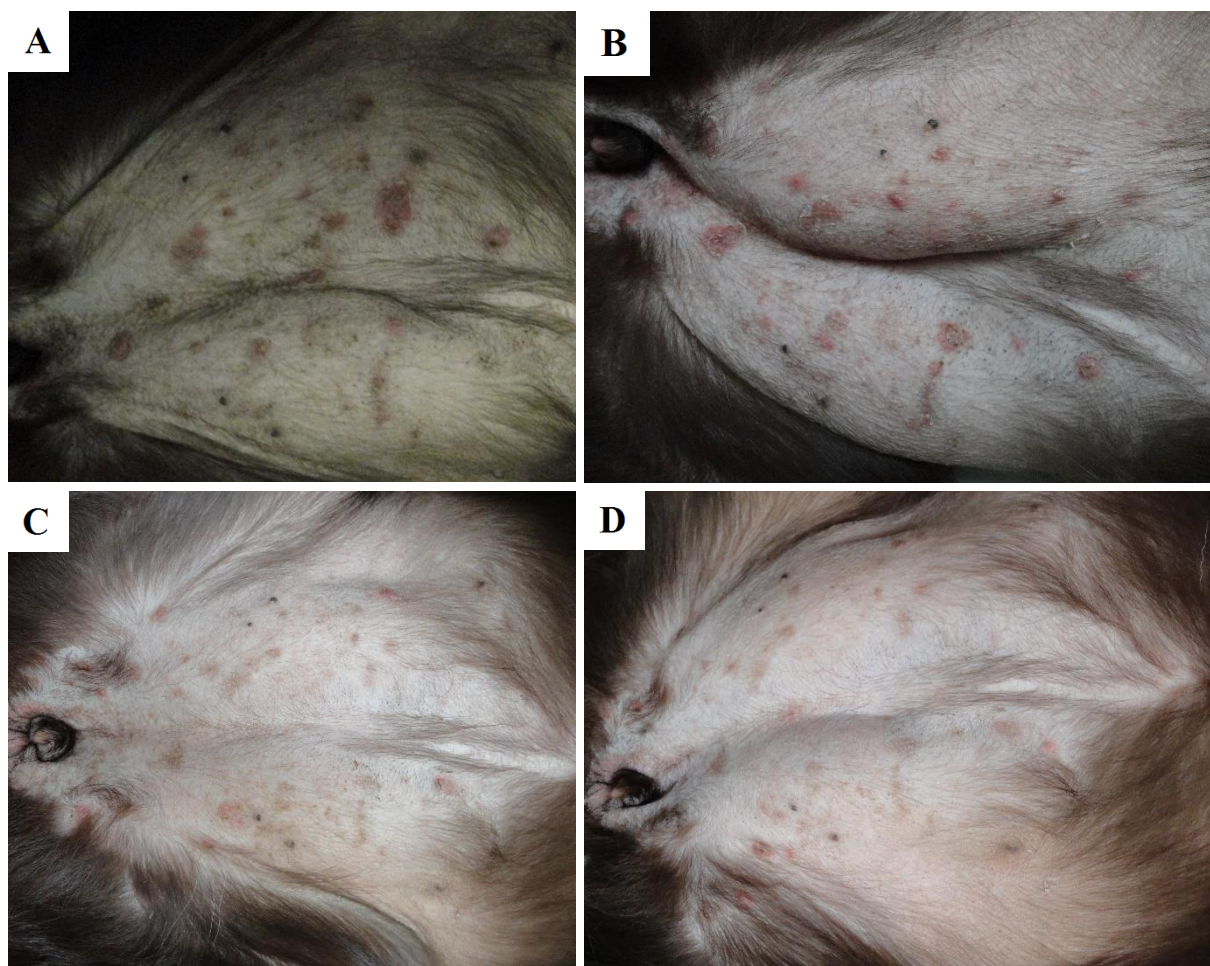
4.2.1. Randomização

Embora globalmente o grupo Clor pareça ter iniciado o ensaio clínico com um *score* clínico e um *score* citológico ligeiramente mais elevados que os respetivos *scores* no grupo P, tendo em conta as escalas utilizadas na avaliação do estado clínico e da evolução citológica dos doentes, essa diferença não se traduz numa diferença clínica significativa, como aliás não se traduziu numa diferença estatística significativa. Da mesma forma, a distribuição das idades e peso, doenças concomitantes associadas e, também, do tipo de infeção e da suscetibilidade global do agente etiológico aos antibióticos testados foi semelhante entre os grupos. Em suma, considera-se que o processo de randomização foi eficaz.

4.2.2. Progressão clínica e citológica

Com a utilização da polihexanida foi observada uma melhoria clínica em 6 de 8 casos com pelo menos uma consulta de seguimento (doentes n.ºs 4, 11a, 11b, 12, 15 e 16), i.e. em 75% desses doentes (Figura 33). Nos outros dois casos não se observou qualquer alteração clínica relevante após 7 (doente n.º 3) e 9 dias de tratamento (doente n.º 8). Tendo em conta a resposta citológica nestas duas doentes (Anexo 15), seria expectável que, caso o tratamento com polihexanida tivesse sido continuado, fosse observado algum grau de melhoria clínica na doente n.º 3, ainda que não muito acentuado e que o estado clínico da doente n.º 8 se mantivesse inalterado ou, mais provavelmente, agravasse. Aproximadamente 67% desses doentes (4/6; ou 50% do total de doentes no grupo P) apresentaram uma melhoria clínica de pelo menos 50% associada a cura citológica e todos esses doentes atingiram a cura clínica no máximo até aos 31 dias de tratamento. A doente n.º 7 não foi observada após a consulta de inclusão, mas o motivo principal para a perda de seguimento foi, alegadamente, a cura clínica.

Figura 33 – Exemplo de melhoria clínica equivalente a uma redução do *score* clínico inferior a 50%, mas ainda assim evidente – doente n.º 4 (fotografias da autora).



A – região abdominal e inguinal no dia 0 do tratamento (tx); B – ao 8.º dia do tx; C – ao 19.º dia; D – ao 26.º dia.

A percepção das pessoas responsáveis pela aplicação do tratamento sobre a evolução do estado clínico dos doentes foi praticamente ao encontro das observações clínicas. No grupo P, 83% das pessoas notaram uma melhoria clínica $\geq 50\%$ (Figura 30) vs. 67% de doentes que realmente mostraram uma redução de pelo menos 50% do *score* clínico. A diferença foi na avaliação da doente n.º 4 (Figura 33), para a qual o *feedback* foi de 50% de melhoria, mas a redução de *score* clínico foi inferior a 50%. Ademais, tendo em conta os 50% de doentes que alcançaram a cura clínica neste grupo, seria de esperar que o *feedback* de 67% (4/6) das pessoas fosse de “100% de melhoria”, mas apenas 33% (2/6) deram respostas compatíveis com a resolução total da infeção em ambas as avaliações; uma pessoa considerou que a melhoria foi $<100\%$, mas indicou a opção “resolução total das lesões” na avaliação qualitativa; a última considerou que “houve resolução quase total das lesões” e mais que 50% de melhoria, provavelmente porque a doente manteve um grau de prurido residual e esporádico na região interdigital e algumas semanas depois – já fora do projeto – apresentou nova infeção na mesma região. O responsável pela doente n.º 16 considerou que não houve qualquer melhoria clínica, embora tenha havido uma

ligeira melhoria do *score* clínico entre T0 e T2, sendo a situação global difícil de avaliar devido à violação do protocolo observada entre T2 e T3.

No grupo Clor foi observada uma melhoria clínica em 6 de 10 casos (doentes n.ºs 1, 2, 6, 13, 17 e 18), i.e. em 60% desses doentes. Embora o *score* clínico da doente n.º 9 tenha diminuído ao longo do tratamento, não faz sentido considerar a sua progressão clínica favorável em termos globais (ponto 4.2.4). Aproximadamente 33% desses doentes (2/6; ou 20% do total de doentes no grupo Clor) mostrou uma melhoria clínica de pelo menos 50% associada a cura citológica; um deles alcançou a cura clínica aos 21 dias (doente n.º 2); segundo aquilo que foi transmitido por correio eletrónico, o outro doente (doente n.º 18) terá alcançado a cura clínica, mas não compareceu às últimas consultas de seguimento, logo não foi possível confirmar que isso tenha realmente ocorrido e, além disso, de acordo com as respostas ao questionário individual este doente não mostrou nem “100% de melhoria” nem “resolução total das lesões”. A disparidade entre as avaliações dos questionários e as observações clínicas no grupo Clor traduzem muito bem certas limitações do projeto, mais à frente discutidas. Em suma, neste grupo, 56% (5/9) das pessoas notaram uma melhoria clínica $\geq 50\%$ (Figura 30) vs. 22% (2/9) de doentes que realmente mostraram uma redução de pelo menos 50% do *score* clínico. Todavia, só uma pessoa assinalou a resolução completa da infeção, o que vai ao encontro do observado, ainda que não traduza completamente a realidade, pois muitos mais atingiram a cura citológica.

A influência das doenças oncológicas no estado inflamatório e pruriginoso da doente n.º 3 e a imunodepressão provocada pela mitoxantrona poderiam ditar uma fraca progressão clínica, sendo muitos os fatores capazes de influenciar a resposta ao tratamento. Por outro lado, as amostras para citologia cutânea podem não ter sido representativas nesta doente, tendo em conta o tipo de lesões envolvidas – hiperpigmentação, seborreia, eritema e alopecia – que, ao contrário de pústulas ou pápulas, não têm margens definidas e, nesta doente em concreto, cobriam uma área relativamente extensa na região inguinal. Ainda assim, é pouco provável que a diferença observada na citologia entre T0 e T1 não fosse real e, de facto, este tipo de lesões poderá estar relacionado com uma evolução mais lenta do *score* clínico.

Para a doente n.º 8, a polihexanida parece não ter sido eficaz. O caso desta doente é um pouco duvidoso, pois foi o único em que o frasco devolvido estava totalmente vazio após 9 dias de utilização quando para todos os outros doentes – incluindo uma doente da mesma raça e mesmo porte, com lesões em zonas semelhantes – o produto foi suficiente para o tempo de utilização e quando praticamente todos os frascos devolvidos continham ainda uma quantidade mais ou menos apreciável da solução antisséptica. Isto indica que pode ter havido falhas de adesão à terapêutica, mas apenas se pode especular sobre potenciais cenários. O primeiro é que o produto pode não ter sido aplicado. Outro cenário é o de uma aplicação excessiva quer em frequência

quer em quantidade, mas nesse caso seria de esperar que a melhoria citológica fosse, então, evidente se a polihexanida fosse eficaz. Por outro lado, a recomendação de um período mínimo de vigilância de 10 minutos pode não ter sido cumprida e, nesse caso, a eficácia da polihexanida seria comprometida por um inadequado tempo de contacto. Assumindo uma adequada adesão à terapêutica, não houve qualquer evidência de que a polihexanida tenha sido eficaz contra as leveduras *Malassezia* nesta doente em particular. Banovic et al. (2013) utilizaram uma solução de polihexanida a 0,1% obtida a partir da diluição de uma solução pura de polihexanida a 1% e avaliaram diluições posteriores dessa primeira diluição em 10 isolados de *M. pachydermatis*. O crescimento das leveduras foi inibido por diluições de até 1:32 para 3 e 5 minutos de contacto, exceto para um isolado com 3 minutos de contacto. Contudo, a concentração fungicida mínima (CFM) foi bastante mais elevada do que a CBM para as bactérias também testadas, *S. pseudintermedius* e *P. aeruginosa*, pelo que as leveduras *M. pachydermatis* parecem ser menos suscetíveis à polihexanida que estas bactérias. O mesmo foi, porém, observado para a clorexidina – também avaliada nesse estudo – e sabe-se que a clorexidina é eficaz no tratamento da dermatite por *Malassezia* (Maynard et al., 2011). Ademais, a concentração de polihexanida utilizada neste projeto foi muito superior às indicadas nos estudos de Banovic et al. (2013) e Finger et al. (2012). Banovic et al. (2013) alertam para as alterações de pH *in vivo* que podem influenciar a ação antimicrobiana destes antissépticos, nomeadamente as alterações de pH cutâneo relacionadas com diversas doenças e a interação com exsudados na pele. No cão, o pH da pele tende a ser mais alcalino que noutros mamíferos (Matousek & Campbell, 2002). Segundo o estudo mais alargado sobre esta matéria, o pH médio varia entre 4,94 e 8,26 em cães adultos, sendo o pH médio global de 6,63 (Ferreira, 2010). O maior intervalo descrito vai de 4,84 a 9,95 (Matousek & Campbell, 2002; Miller et al., 2013). Por outro lado, o crescimento da espécie *M. pachydermatis* é ótimo entre 4,0 e 8,0 e parece ser inibido quando o pH do meio é excessivamente ácido, i.e. $\leq 3,0$, ou excessivamente alcalino, i.e. $\geq 9,0$ (Matousek, Campbell, Kakoma, Solter & Schaeffer, 2003). Foi ademais sugerido que um pH cutâneo mais alcalino – como o da pele de cães com dermatite atópica, como é o caso da doente n.º 8 – pode melhorar o crescimento destas leveduras, embora não seja provável que isso se verifique com todos os genótipos da espécie (Kobayashi, Kano, Nagata, Hasegawa & Kamata, 2011). Como já referido, a estabilidade da polihexanida é melhor para pH de 5 a 7 (Küsters et al., 2013). Tendo em conta estes aspetos, o pH do microambiente cutâneo pode ter tido, de facto, influência na resposta ao tratamento, pois se fosse tendencialmente alcalino, entre 7,0 e 8,0, por exemplo, seria ainda favorável à proliferação das leveduras, mas estaria já acima do ideal para a polihexanida, cuja ação pode ter sido, portanto, mitigada. Nestes doentes com infeção exclusiva por leveduras seria interessante medir o pH cutâneo antes, durante e após o tratamento e analisar a relação com a

resposta ao tratamento para se perceber se há, realmente, alguma influência importante e, adicionalmente, compreender melhor o papel do pH na fisiopatologia da dermatite por *Malassezia*. As próprias leveduras podem alterar o pH e produzem algumas enzimas que podem ter afetado a ação da polihexanida, designadamente fosfolipases e sulfatase da condroitina (Chen & Hill, 2005; Coutinho & Paula, 2000; Miller et al., 2013). As primeiras hidrolisam sobretudo glicerofosfolípidos, mencionados atrás a propósito do mecanismo de ação da polihexanida, pois são moléculas com as quais esta interage fortemente (Kaehn, 2010; Souza et al., 2015; Teramoto et al., 2015). Se a estirpe envolvida produzia, realmente, fosfolipases, pode ter havido uma diminuição da capacidade de ligação da polihexanida às células e isso poderia significar não só uma redução da sua ação antifúngica, como do seu efeito residual. As lipases também produzidas por estas leveduras não teriam teoricamente tanta influência como as fosfolipases, pois atuam nos lípidos neutros, i.e. apolares, com os quais a polihexanida não deverá interagir. A sulfatase da condroitina pode levar a um aumento de sulfato de condroitina no microambiente cutâneo, que, como já referido, é capaz de neutralizar a polihexanida (Müller & Kramer, 2000). Por fim, há que ter em conta que as leveduras *M. pachydermatis* desta doente podiam ser tolerantes ou resistentes à polihexanida. Finger et al. (2012) sugeriram que o n.º de camadas da parede celular das leveduras e o tamanho da célula podem ser importantes na capacidade para tolerar estes antissépticos: as leveduras maiores e com uma parede celular mais espessa seriam mais tolerantes; apesar de se referirem às leveduras *C. albicans*, maiores e com uma parede celular mais espessa que as leveduras *M. pachydermatis*, há registo de diferentes espessuras da parede celular e tamanhos nas leveduras *M. pachydermatis*, com alguns tipos celulares mais pequenos (2,5 a 4,8 µm por 2,6 a 5,0 µm) e outros maiores (3,8 a 6,0 µm por 4,8 a 7,0 µm) (David, Gabriel & Kopecká, 2003). Nas leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, o gene NCW2, que codifica uma proteína da parede celular (*Novel Cell Wall protein 2*), parece fazer parte dos mecanismos de tolerância à polihexanida, havendo uma maior suscetibilidade com a depleção desse gene e um aumento da sua regulação com a exposição à polihexanida (Elsztein, de Lima, de Barros Pita & de Moraes, 2016). Além disso, no passado tinha sido já detetada uma aparente relação entre certos genes implicados na via da integridade da parede celular e uma maior tolerância à polihexanida (Elsztein, de Lucena & de Moraes, 2011). Não há estudos a este respeito quanto às leveduras *Malassezia*. O facto de a infeção desta doente ter passado de fúngica a mista não deixa também de ser interessante. As relações entre os microrganismos da microbiota cutânea do cão não estão, ainda, muito estudadas nem tão pouco a influência dos antimicrobianos de uso tópico nessas comunidades. A polihexanida pode ter reduzido ou eliminado transitoriamente algumas bactérias da microbiota cutânea nas regiões onde foi aplicada e ter criado, assim, uma vantagem competitiva para as bactérias do tipo cocos

observadas em T1, que eram, provavelmente, *S. pseudintermedius*. O efeito da polihexanida na dinâmica populacional de algumas comunidades microbianas foi já parcialmente avaliado no estudo de Moore, Ledder, Gilbert e McBain (2008), mas são necessários estudos dirigidos especificamente à microbiota cutânea do cão. Nesse estudo em particular, o género *Ralstonia* mostrou um ligeiro aumento de suscetibilidade à exposição crónica de polihexanida e, como atrás descrito, parece ser um dos géneros bacterianos mais abundantes na pele do cão, por isso seria talvez razoável assumir que pudesse ter sido afetado pela polihexanida, contudo este género bacteriano parece estar ausente da pele de cães alérgicos (Hoffmann et al., 2014) e, portanto, não se podem fazer suposições neste sentido quanto à doente n.º 8. Há menos diversidade microbiana na pele dos cães alérgicos comparativamente a cães sadios (Hoffmann et al., 2014), pelo que talvez seja mais fácil induzir desequilíbrios na microbiota cutânea – como por exemplo através da aplicação de antissépticos – com consequente vantagem competitiva para microrganismos oportunistas, especialmente se já existe um desequilíbrio – uma infeção, por exemplo, como era o caso. Este agravamento e alteração da infeção inicial foi observado na região interdigital, que é uma região em contacto permanente com o solo e que possui um microambiente particular, pelo que a alteração dos microrganismos observados pode não ter tido qualquer relação com a polihexanida. Não se recolheram amostras das restantes zonas afetadas, porque em termos clínicos o agravamento observado era suficiente para a decisão de alterar o plano terapêutico, contudo, no contexto do projeto, teria sido importante avaliar todas as regiões afetadas e isso será algo a considerar para projetos futuros.

As curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier permitem estimar o tempo até à ocorrência de um determinado evento de interesse. Para este estudo foram investigados três eventos de interesse, designadamente o tempo até se observar uma redução de pelo menos 50% do *score* clínico e concomitante cura citológica (curva 1), o tempo até cura clínica (curva 2) e o tempo até cura citológica (curva 3). A preparação dos dados para a análise de sobrevivência permitiu identificar certas limitações associadas ao projeto, mais especificamente associadas à origem da amostra e às escalas utilizadas para avaliação da progressão clínica e citológica, que ainda assim tinham sido perceptíveis no decorrer das consultas. O principal problema na interpretação das curvas de sobrevivência diz respeito aos casos censurados, especialmente quando são muitos e a amostra é pequena. Estes fatores tornam as estimativas menos precisas (Rich et al., 2010). Além disso, a extremidade da curva, i.e. a zona mais à direita, representa uma estimativa bastante menos precisa que o início da curva, porque o número de doentes vai sendo cada vez menor, seja pela ocorrência do evento de interesse e/ou pela acumulação de casos censurados (Rich et al., 2010). A análise das curvas de sobrevivência permite constatar que, no grupo P, o número de doentes que mostrou redução de pelo menos 50% do *score* clínico associada à cura citológica foi igual

ao número de doentes que atingiu a cura clínica – $n=4$, representados por cada degrau na curva de sobrevivência – o que significa que todos os doentes que atingiram o patamar de redução de pelo menos 50% do *score* clínico alcançaram, eventualmente, a cura clínica. O facto de haver tantos casos censurados, principalmente por causa da elevada taxa de *dropouts*, preconiza uma interpretação cautelosa da curva. Quando há casos censurados entre eventos, a probabilidade cumulativa de sobrevivência entre os intervalos diminui consideravelmente (Rich et al., 2010). No caso da curva 1, por exemplo, isto indica que a probabilidade de um doente apresentar uma redução de pelo menos 50% do *score* clínico e cura citológica a dada altura após a censura de alguns casos é, provavelmente, sobrestimada. De facto, no grupo P, ao dia 24 a probabilidade de que isso tenha acontecido é aproximadamente 74%, mas na realidade verificou-se para 50% dos doentes. É, por isso, importante a representação gráfica dos intervalos de confiança de 95% para cada uma das curvas de sobrevivência.

Embora tenha havido uma diminuição global do prurido no decorrer do período de tratamento, essa diminuição não mostrou qualquer relação significativa com qualquer um dos tratamentos antissépticos. A resolução progressiva da infeção pode reduzir o grau de prurido destes doentes na medida em que é menos um fator contributivo para um limiar de prurido excedido e, muito provavelmente, foi de facto importante para a diminuição do prurido em alguns doentes. Porém considera-se que a evolução do grau de prurido foi sobretudo influenciada pela administração e/ou aplicação tópica de glucocorticoides, que se verificou na maioria dos casos e, ainda, pela administração de ciclosporina nalguns doentes.

Houve tendencialmente uma evolução mais rápida do *score* citológico do que do *score* clínico e, para alguns doentes, observou-se cura citológica, mas não cura clínica, efeito bastante notório no grupo Clor. É, no entanto, provável que esse efeito flagrante no grupo Clor se deva sobretudo ao viés introduzido por esta amostra particular de doentes e pelas limitações das escalas de avaliação. Um exemplo perfeito é o do doente n.º 5 (ponto 4.5.4), que embora não tenha atingido a cura clínica segundo o que foi definido no projeto – i.e. critérios iguais para todos os doentes sob o risco de não ser possível comparar os resultados de forma correta – mostrou, para todos os efeitos, resolução total da infeção, tal como seria considerada fora do projeto, num contexto mais regular. Acresce que pode ter havido um viés relacionado com a avaliação das lâminas fora do período de consultas devido à possibilidade de um exame mais minucioso e demorado, que pode ter permitido detetar mais do que aquilo que seria habitual e potencialmente observado no exame em consulta, com o risco associado de sobrestimação do *score* citológico. Não foi encontrada qualquer relação entre o tipo de infeção ou de lesões e o tempo até resolução clínica ou citológica, mas não quer dizer que uma tal relação não exista. Para alcançar conclusões mais sólidas sobre este aspeto seria necessário uma amostra bastante maior e mais representativa.

4.2.3. Dropouts

Uma taxa global de *dropouts* de 42% é excessiva, mesmo para um estudo de caráter preliminar (Fewtrell et al., 2008; Kristman, Manno & Côté, 2004). Ao reduzir ainda mais uma amostra já de si pequena para o tipo de objetivos envolvidos, reduziu certamente o poder do ensaio clínico, i.e. a potência da análise estatística. Nos poucos ensaios clínicos na mesma área de atuação e com o mesmo tipo básico de desenho experimental, as taxas globais de *dropouts* rondaram ou 9% a 10% (Jakobsson, 2011; Loeffler et al., 2011) ou 19% a 20% (Borio et al., 2015; Maynard et al., 2011; Seltzer et al., 2010). O doente retirado do projeto devido a violação dos critérios de elegibilidade (doente n.º 1) tinha um historial clínico relativamente recente de piodermite profunda, mas a dimensão dessa problemática arrastada só foi detetada já depois da inclusão no projeto, em T2. A verificação mais detalhada desses registos na investigação do cumprimento dos critérios de elegibilidade talvez pudesse ter evitado a inclusão do doente, pois daí poderia ter resultado um exame físico mais cauteloso para garantir que não existiam lesões crónicas sob grande risco de infeção, que pudessem vir a pôr em causa a participação do doente no estudo. Ainda assim, não se identificaram lesões ativas de piodermite profunda no exame físico inicial e tanto o registo escrito como o registo fotográfico foram revistos nesse sentido. É provável que as lesões crónicas de alopecia, liquenificação e hiperpigmentação tivessem sido observadas, mas na ausência de sinais óbvios de infeção ativa não se efetuou qualquer exame citológico, talvez erradamente. Contudo, não se pode excluir que tenha havido uma falha no exame físico. Essas lesões localizavam-se na região coxofemoral de ambos os membros e não eram imediatamente visíveis devido à pelagem longa do doente. Ainda assim, crê-se que não foi esse o caso e que não existissem, de facto, sinais clínicos de infeção. Talvez a infeção tivesse sido detetada mais cedo, se o doente tivesse sido encaminhado para avaliação logo após a primeira semana de tratamento. A cultura e TSA/CIM com origem nestas lesões revelaram uma infeção por MRSP. O responsável pelo doente era profissional de saúde de Medicina Humana, médico-cirurgião, o que pode ter tido implicações quanto ao tipo de agente patogénico isolado, muito embora as implicações sejam talvez maiores no sentido inverso; este fator dificultou bastante o seguimento do doente, porque estava associado a uma fraca disponibilidade de tempo (ponto 4.5.1). Visto que as lesões que levaram à inclusão do doente pareciam estar a melhorar progressivamente e que se aguardavam os resultados da cultura e TSA/CIM, o biocida não foi imediatamente descontinuado.

4.2.4. Reações adversas

A doente excluída por suspeita de reação adversa (doente n.º 10) tinha um *score* clínico inicial relativamente baixo (Anexo 13), essencialmente devido a eritema e escassas pápulas pontuais.

À data de exclusão, o *score* clínico tinha aumentado 6 pontos e o grau de prurido tinha atingido o topo da escala de avaliação (grau 10/10). O exame citológico, por sua vez, estava praticamente inalterado. Como a doente estava a cargo de uma colega de estágio, foi possível obter um bom registo fotográfico mesmo entre consultas, que permitiu analisar a evolução dos sinais clínicos com mais detalhe para tentar decifrar o padrão de evolução da reação adversa. Os sinais que levaram a essa suspeita não se manifestaram subitamente, pois percebe-se uma progressão local no grau de eritema, já notório no início da segunda semana de tratamento, em especial a partir do 10.º dia. Porém, como os sinais clínicos iniciais da doente eram sobretudo eritema e prurido intenso, torna-se difícil fazer a distinção entre manifestações iniciais de reação adversa e falta de resposta ao tratamento. A presença de escamas começou a notar-se apenas a partir do 11.º dia de tratamento e agravou-se quase diariamente. Após a suspensão da clorexidina notou-se ainda um ligeiro agravamento das lesões, mas ao 5.º dia havia uma clara melhoria clínica e ao 22.º dia a pele tinha um aspeto praticamente normal, com apenas algumas escamas localizadas, de muito menor tamanho, que desapareceram com o tempo. Não existe grande informação sobre reações adversas à clorexidina em Medicina Veterinária, embora seja de conhecimento geral que alguns cães podem apresentar irritação cutânea subsequentemente à sua aplicação (Morris, 2013a). Em alguns estudos do mesmo grupo de investigação japoneses não se detetaram quaisquer reações adversas com a aplicação de uma solução de acetato de clorexidina a 2% (Murayama et al., 2010b; Murayama, Terada, Okuaki & Nagata, 2011; Nagata, Murayama & Shibata, 2006), de um champô de gluconato de clorexidina a 2% e miconazol a 2% (Murayama, Nagata, Terada, Shibata & Fukata, 2010a) ou de um champô de gluconato de clorexidina a 4% (Murayama et al., 2010b). Na maioria destes estudos, o tratamento durou apenas uma semana, durante a qual a clorexidina foi aplicada duas vezes. Foi também utilizado um protocolo com a aplicação da solução de acetato de clorexidina de dois em dois dias, com uma duração máxima de duas semanas. Além disso, os autores recomendaram sempre o enxaguamento dos doentes depois da aplicação da clorexidina, com um tempo de contacto de 5 minutos. Outros estudos direccionados para a dermatite por *Malassezia* não detetaram quaisquer reações adversas com a utilização de um champô de gluconato de clorexidina a 2% e miconazol a 2% (Bond, Rose, Ellis & Lloyd, 1995; Maynard et al., 2011). Os registos de reações adversas à clorexidina que se encontram esporadicamente em estudos quer de tratamento de infeções quer de preparação pré-cirúrgica referem-se a concentrações de clorexidina superiores a 2%. Maynard et al. (2011) mencionam alguns efeitos transitórios com o champô de digluconato de clorexidina a 3% aplicado três vezes por semana durante duas semanas, designadamente pododermatite – embora os autores não tenham clarificado esta situação – descamação visível e aumento do prurido, que resolveram espontaneamente sem interrupção do tratamento. Por outro lado, Loeffler et al.

(2011) não registaram quaisquer reações adversas com um champô de gluconato de clorexidina a 3% aplicado duas vezes por semana. Osuna, DeYoung e Walker (1990), que utilizaram gluconato de clorexidina a 4% seguido da aplicação de álcool a 70% ou de uma solução de NaCl esterilizada para a preparação pré-cirúrgica da pele, registaram efeitos adversos em cerca de 15% e 21% dos doentes de cada grupo, respetivamente. Não há, contudo, menção ao tipo de efeitos observados. No estudo de Borio et al. (2015), dois doentes mostraram eritema, escamas e prurido, sendo por isso retirados do estudo. Em suma, o tipo de protocolo e a formulação da preparação no presente trabalho podem ter sido determinantes para aquilo que se pensa ter sido uma reação adversa na doente n.º 10, já que a concentração utilizada foi de 2% e as reações adversas com sinais clínicos semelhantes – eritema, escamas e prurido – são tendencialmente mencionadas para protocolos que utilizam concentrações $\geq 3\%$ e/ou frequências de aplicação superiores a duas vezes por semana. O efeito residual da clorexidina pode ter contribuído para o agravamento ligeiro dos sinais clínicos nos primeiros dias após interrupção, sobretudo porque não se efetuou um banho para promover a sua remoção. Os estudos do grupo de investigação japoneses podem não ter registado reações adversas, mas foram aqueles que usaram menores concentrações e frequências de aplicação.

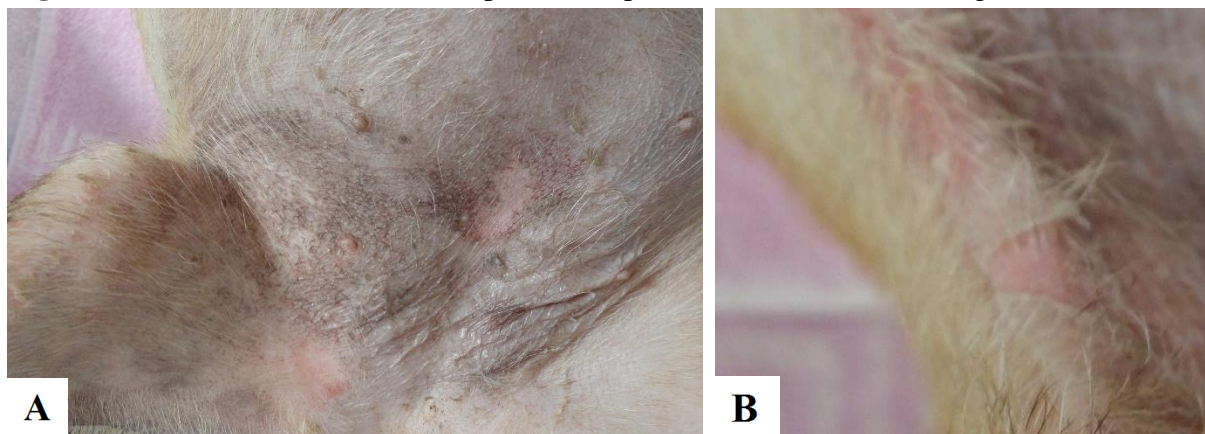
Todos os antissépticos têm propriedades potencialmente irritantes para a pele, como as têm a maioria dos compostos químicos em contacto direto com a pele (Lachapelle, 2014). Ora, um irritante cutâneo é um composto capaz de provocar lesões nos queratinócitos quando aplicado na pele, exercendo efeitos citotóxicos diretos e promovendo a inflamação local (Ho, Campbell & Lavergne, 2015). Embora as lesões dependam diretamente da concentração do composto irritante, há outros fatores envolvidos, como o tempo de contacto, a potência intrínseca desse composto, a região onde é aplicado, o veículo da preparação, fatores do meio ambiente – como temperatura e humidade – ou a presença de lesões cutâneas (Ho et al., 2015; Lachapelle, 2014; Weitz et al., 2013). À reação cutânea inflamatória e inespecífica desencadeada por estes compostos dá-se o nome de dermatite de contacto irritativa (DCI) (Ho et al., 2015). Em Medicina Humana, este é o tipo de reação cutânea mais frequentemente observado após contacto direto com a clorexidina (Weitz et al., 2013), mas é aquele considerado menos preocupante (Silvestri & McEnery-Stonelake, 2013). A preocupação tem sido, sim, cada vez maior com o potencial alergénico deste antisséptico (Calogiuri et al., 2013; Silvestri & McEnery-Stonelake, 2013). As reações alérgicas à clorexidina não são comuns, mas parecem ser cada vez mais frequentes (Silvestri & McEnery-Stonelake, 2013). Entre as reações descritas em Medicina Humana estão a dermatite de contacto alérgica (DCA), que é uma reação de hipersensibilidade de tipo IV e algumas reações do tipo imediato, i.e. relativas a hipersensibilidade do tipo I, mais especificamente reações urticariformes, angioedema e

reações anafiláticas (Lachapelle, 2014; Silvestri & McEnery-Stonelake, 2013). Uma situação aparentemente pouco comum e já descrita para a clorexidina é a ocorrência de ambos os tipos de reações – retardadas e imediatas – no mesmo doente, o que traduz a importância da anamnese previamente à utilização deste antisséptico (Silvestri & McEnery-Stonelake, 2013). Em Medicina Veterinária não estão descritas quaisquer reações de hipersensibilidade de tipo I e ainda que haja suspeitas sobre aparentes manifestações de DCA associadas à clorexidina, em certos doentes pontuais, ainda não há artigos publicados sobre o assunto. É provável que a maioria das reações observadas esteja relacionada com as propriedades irritantes da clorexidina – tal como sucede em Medicina Humana – e talvez a DCI se torne mais comum em Medicina Veterinária com a crescente utilização da clorexidina na prática clínica. Miller et al. (2013) referem que a clorexidina “não é irritante”, mas esta frase remonta, provavelmente, às primeiras edições do manual. Regra geral, sabe-se pouco sobre as dermatites de contacto em Medicina Veterinária, mas os sinais clínicos em cães parecem ser semelhantes aos que se observam nas pessoas (Ho et al., 2015). Tanto na DCI como na DCA, as lesões estão normalmente localizadas nas zonas onde houve contacto com o agente causador, mas enquanto na DCI tendem a ser bem delimitadas na DCA podem não estar tão bem definidas; tendem a surgir nas áreas mais glabras ou de menor densidade pilosa. Os tipos de lesões mais comuns incluem edema, eritema, pápulas, escamas, fissuras e liquenificação, sendo que as últimas três são mais habituais com a cronicidade do processo. Na DCI é comum ocorrer ulceração e necrose da epiderme e é mais provável que os doentes manifestem dor ou desconforto nesta situação do que na DCA. Na DCA as vesículas são mais comuns que na DCI e é mais provável que as lesões originem prurido (Ho et al., 2015). Não é possível afirmar com certeza que tipo de dermatite de contacto terá sido observado na doente n.º 10, se é que o foi de todo. Pode, inclusive, ter sido apenas o resultado da progressão da doença por falta de resposta ao tratamento. Miller et al. (2013) referem que alguns cães com dermatite por *Malassezia* podem ter uma apresentação clínica semelhante a uma dermatite de contacto (“*contact dermatitis-like disease*”), em que as lesões surgem sobretudo a nível ventral e são bem demarcadas. Estes autores são também dos poucos a referir que alguns destes doentes podem apresentar descamação focal em placas. Pensa-se que a descontinuação da clorexidina foi benéfica para a progressão favorável do estado clínico desta doente, mas mais do que isso foi essencial o adequado tratamento com antifúngico por via oral. Embora a descamação observada tenha sido um pouco generalizada, foi mais grave na zona abdominal e inguinal, que além de serem zonas glabras, onde há um contacto mais direto do antisséptico com a pele, foram também as zonas onde a clorexidina foi aplicada com maior insistência, o que está de acordo com a distribuição lesional referida para a dermatite de contacto. Acresce que a infeção por leveduras e a dermatite atópica não controlada podem ter

aumentado o potencial irritante da clorexidina criando um efeito de bola de neve. Neste caso, ainda que a clorexidina tivesse tido algum efeito antifúngico, este efeito pode ter sido descompensado pela proliferação das leveduras numa pele cada vez mais debilitada. Sabe-se também que a doente estaria por vezes vestida para evitar escoriações devido ao prurido intenso. Esta oclusão da pele pode ter sido um fator importante na promoção de uma dermatite de contacto à clorexidina, tal como descrito em Medicina Humana (Weitz et al., 2013), mas possivelmente não tão relevante como outros fatores já mencionados porque não seria uma oclusão permanente. A oclusão da pele promove também a proliferação de *Malassezia*. Quanto ao tipo de dermatite de contacto mais provável, poderá ser razoável inferir que tanto uma DCI como uma DCA podem ter estado envolvidas. A clorexidina tem potencial para ambas e a fase de sensibilização de uma DCA pode ter estado associada aos sinais clínicos de uma DCI. Ho et al. (2015) indicam que esta fase pode ocorrer durante um período de semanas a meses, que varia consoante a exposição é intermitente ou contínua e que, tendo ocorrido a sensibilização, a fase de elicitação pode ocorrer em 24 horas após a reexposição. No início do tratamento estava a ser também administrada prednisolona pela via oral, numa dose anti-inflamatória, o que pode ter mascarado sinais iniciais de uma DCI.

Há uma situação que se gostaria ainda de referir, a este propósito, a respeito da doente n.º 9, que aquando da entrada no estudo estava sob o efeito prolongado de doses imunossupressoras de prednisolona. Esta doente completou o tratamento com clorexidina, mas levantou suspeitas quanto a uma possível reação adversa. Contudo, tendo em conta a doença sistémica, o estado de polifarmácia e uma clara atrofia cutânea (Figura 34), juntamente com o facto de a suspensão da clorexidina ter coincidido com a redução da dose de prednisolona e com o início de uma pomada e de um creme reparadores, não foi nem é possível estabelecer essa relação.

Figura 34 – Doente n.º 9 seis dias depois da suspensão da clorexidina (fotografias da autora).



A – eritema ligeiro e hiperpigmentação; é visível a atrofia cutânea; B – pormenor da prega inguinal direita.

Neste ensaio clínico não houve qualquer suspeita de reação adversa à polihexanida, o que está de acordo com a revisão bibliográfica efetuada, que indica que a polihexanida é bastante segura.

4.3. BACTERIOLOGIA VS. RESPOSTA AO TRATAMENTO

4.3.1. Citologia *versus* cultura bacteriana

O género *Staphylococcus* representou 92,3% dos isolados bacterianos (12/13), o que está de acordo com a literatura. A espécie *S. pseudintermedius* foi identificada em 58,3% dos isolados de estafilococos, tendo 41,7% dos estafilococos permanecido por identificar devido a restrições temporárias no LRAB (Eng.^a A. Belas, comunicação pessoal, junho, 2016). O isolado de *E. coli* refletiu muito provavelmente uma infeção real por *E. coli* como agente etiológico principal, porque na citologia cutânea observou-se uma quantidade massiva de bastonetes intra e extracelulares na região perilabial – o local de recolha da amostra para cultura – e uma menor quantidade de cocos e, ademais, na região abdominal foi observado o mesmo padrão de infeção, i.e. com predominância de bastonetes. O isolamento de *E. coli* é relativamente frequente nas piодermites, à parte os estafilococos, tendo representado 6% dos isolados cutâneos no trabalho de Vieira (2008). Os resultados da cultura foram também coincidentes com a citologia cutânea para a maioria dos doentes, com exceção das doentes n.ºs 7, 8 e 12 (Anexos 10 e 15). A prevalência de culturas negativas no estudo de Borio et al. (2015) foi de 9,4%, portanto semelhante à deste trabalho, que foi de 7,1% (1/14). Os autores suspeitam que a demora no transporte das amostras para análise possa ter interferido com a sobrevivência das bactérias. Essa pode também ter sido a causa do resultado negativo da doente n.º 7; é pouco provável que a recolha da amostra não tivesse sido bem-sucedida, porque se tratava de uma região muito localizada e recôndita e havia uma grande quantidade de bactérias de acordo com a citologia. Por outro lado, a cultura pode ter sido negativa devido a especificidades da estirpe recolhida. O resultado da doente n.º 8 foi um pouco surpreendente, porque foi a única estirpe de *S. pseudintermedius* isolada em cultura pura, sem qualquer relação com a citologia perilabial, num caso de infeção exuberante por *Malassezia*. Foram observados cocos intracelulares na citologia da região interdigital e como o *S. pseudintermedius* é residente na mucosa nasal, orofaringe e zona perianal (Fazakerley et al., 2009; Miller et al., 2013) e que daí é disseminado para a pelagem e superfície da pele (Saijonmaa-Koulumies & Lloyd, 1996) é possível que tal se tenha devido a contaminação através do ato de lambar. O resultado da doente n.º 12 não está totalmente de acordo com o que foi observado na citologia axilar, o que pode ser igualmente explicado por fenómenos de transferência de bactérias, embora estejam descritos casos de falta de concordância entre os achados citológicos e aqueles obtidos por cultura.

4.3.2. Perfis de suscetibilidade a antibióticos *versus* resposta ao tratamento

Neste estudo, a frequência de isolados estafilocócicos resistentes a pelo menos um antibiótico foi um pouco inferior àquela descrita por Couto et al. (2016) para o género *Staphylococcus* nas espécies domésticas: 66,7% vs. 79,4%. A frequência de estirpes multirresistentes, por outro lado, foi ligeiramente maior, 41,7% vs. 35% (Couto et al., 2016). Estas diferenças estão muito provavelmente relacionadas com a origem e tamanho da amostra. Os antibióticos para os quais houve maior frequência de estirpes resistentes neste estudo foram a penicilina, a tetraciclina e a ampicilina, o que está tendencialmente de acordo com o estudo de Couto et al. (2016). Não foi encontrada qualquer relação entre o perfil de suscetibilidade a antibióticos (Anexo 11) e a resposta ao tratamento com qualquer um dos antissépticos, o que pode ser consequência do pequeno tamanho da amostra. Na verdade, a relação entre as resistências a certos antibióticos e a suscetibilidade *in vivo* a estes antissépticos é, ainda, algo duvidosa e são necessários estudos em larga escala nesse âmbito. Três dos cinco doentes com infeção atribuível a bactérias multirresistentes (Figura 17) atingiram a cura citológica: dois do grupo Clor, as doentes n.º 6 e n.º 9 e um do grupo P, a doente n.º 12, respetivamente aos 22, 8 e 17 dias de tratamento. Considerando que o isolado bacteriano da doente n.º 8 se disseminou a partir das mucosas, é algo preocupante que esta estivesse colonizada por uma estirpe multirresistente, mas a colonização das mucosas por estafilococos multirresistentes aparenta ser relativamente frequente em cães saudáveis, sendo a colonização particular por *S. pseudintermedius* bastante mais frequente nos cães atópicos que nos cães saudáveis (Fazakerley et al., 2009; Garbacz et al., 2013b). O isolado de *E. coli* obtido neste trabalho tinha um perfil de suscetibilidade (Anexo 11) dentro daquilo que foi observado para os isolados de *E. coli* de origem dermatológica em cães por toda a Europa, nos quais há uma grande prevalência de resistência aos antibióticos β -lactâmicos, uma baixa prevalência de resistência às fluoroquinolonas e uma suscetibilidade aparentemente transversal à gentamicina (Ludwig et al., 2016). A clorexidina foi eficaz na resolução da infeção pela *E. coli* envolvida e seria realmente interessante avaliar, no futuro, o papel deste antisséptico e da polihexanida nas piodermites mediadas por outros agentes que não estafilococos.

4.4. SUSCETIBILIDADE BACTERIANA AOS BIOCIDAS UTILIZADOS

4.4.1. Suscetibilidade *versus* resistência à clorexidina

Há que considerar várias situações possíveis quanto à suscetibilidade das bactérias à clorexidina (Tabela 11). A resistência intrínseca a este antisséptico pode ocorrer por impermeabilidade das células e, em algumas estirpes, por alguma capacidade de inativação por degradação dos sais de clorexidina (Horner, Mawer & Wilcox, 2012; Russell, 2000; Tanaka et al., 2006).

Tabela 11 – Observações possíveis resultantes da interação das bactérias com a clorexidina – tradução livre da tabela 2 do artigo de Horner et al. (2012).

Termo	Definição
Resistência intrínseca	Bactérias intrinsecamente resistentes à CHX, como micobactérias ou esporos bacterianos
Tolerância fenotípica	Sobrevivência na presença de CHX devido a um baixo metabolismo ou condições do meio transitórias, como a presença de biofilme
Tolerância à CHX	Estirpe bacteriana que é inibida, mas não eliminada pela CHX, como sucede com a exposição à concentração bacteriostática utilizada <i>in vitro</i> (4 mg/L)
Resistência à CHX	Estirpe bacteriana que pode sobreviver à exposição à CHX a uma concentração que mata toda a restante população bacteriana, tal como a concentração bactericida normalmente utilizada de 4% (40000 mg/L)

CHX – clorexidina.

As bombas de efluxo constituem o mecanismo principal de diminuição de suscetibilidade aos biocidas, como é o caso da tolerância à clorexidina na espécie *S. aureus*, normalmente mediada pelo gene *qacA*, embora possam estar implicados outros genes *qac* (Horner et al., 2012). Os genes *qacA* e *qacB* foram já detetados na espécie *S. pseudintermedius*, contudo não têm sido associados a alterações na suscetibilidade à clorexidina (Couto et al., 2014; Uri et al., 2016). Por outro lado, a presença do gene *qacA* não envolve necessariamente a expressão fenotípica de uma diminuição de suscetibilidade à clorexidina, o que foi observado em alguns estudos com *S. aureus* (Horner et al., 2012; Uri et al., 2016) e os estafilococos podem apresentar outros genes relacionados com bombas de efluxo que apesar de não estarem diretamente relacionadas com a diminuição de suscetibilidade à clorexidina podem, eventualmente, contribuir para tal (Horner et al., 2012). Estes genes podem ser transmitidos por plasmídeos entre estirpes de *S. aureus* e, potencialmente, entre *S. aureus* e outros estafilococos (Horner et al., 2012), o que pode levantar questões quanto aos cães colonizados por *S. aureus*, em especial os que vivem com profissionais de saúde de Medicina Humana (Boost, O'Donoghue & James, 2008) ou de Medicina Veterinária (Hoet et al., 2013). Em Medicina Humana parece haver uma associação entre a diminuição de suscetibilidade à clorexidina e a multirresistência de algumas estirpes de *S. aureus* e há cada vez mais referências sobre uma aparente menor suscetibilidade à clorexidina de estirpes de MRSA vs. estirpes de MSSA. Há, no entanto, estudos contraditórios neste sentido e também não se sabe até que ponto as observações *in vitro* se traduzem num problema real, porque as CIM/CBM habitualmente indicadas são largamente excedidas *in vivo* (Horner et al., 2012). Porém, coloca-se o problema da exposição a concentrações subterapêuticas de clorexidina sobretudo se considerado o seu efeito residual (Horner et al., 2012; Thomas, Maillard, Lambert & Russell, 2000). Efetivamente, num estudo que investigou a suscetibilidade de várias estirpes multirresistentes às concentrações de digluconato de clorexidina habitualmente utilizadas na prática clínica, nomeadamente 4%, 2%, 0,5%, 0,1%, 0,05% e 0,02%, observou-se que todos os

isolados foram suscetíveis à concentração de 4% com apenas 5 minutos de contacto, mas à medida que a concentração diminuiu a suscetibilidade dos isolados de *S. aureus* e *P. aeruginosa* também diminuiu bruscamente (Ekizoğlu, Sağiroğlu, Kiliç & Hasçelik, 2016). A diminuição de suscetibilidade à clorexidina após exposição a concentrações ditas subinibitórias já tinha sido observada para a espécie *P. aeruginosa* no estudo de Thomas et al. (2000). A exposição crescente e sequencial a concentrações subinibitórias de diacetato de clorexidina – inicialmente entre 0% e 0,0018% e, depois, 0,004%, 0,005%, 0,006% e 0,007% – resultou num aumento de tolerância irreversível, que os autores indicaram poder estar relacionado com uma adaptação fisiológica destas bactérias através de alterações na regulação de certos processos bioquímicos e/ou de alterações no envelope bacteriano (Thomas et al., 2000). Coenye et al. (2011) estudaram a tolerância à clorexidina e a resposta transcriptómica à exposição a este biocida em estirpes de *Burkholderia cenocepacia*, tendo detetado nas células em biofilmes um aumento da expressão de vários genes, sobretudo genes relativos a proteínas reguladoras e associadas à membrana celular e à resistência a antimicrobianos; após exposição houve uma maior expressão de genes que codificam proteínas relacionadas com mobilidade e quimiotaxia e uma menor expressão de um gene que codifica uma adesina particular, que os autores sugeriram que pudesse representar uma tentativa de regressão a um estado de vida livre que permitisse às células “escaparem” do biofilme impregnado com clorexidina. Thomas et al. (2000) avaliaram adicionalmente o efeito da exposição repetida à concentração residual de 0,0005% e o efeito de uma única exposição às concentrações de 0,0001%, 0,00025% e 0,0005%, que também resultou na diminuição da suscetibilidade, i.e. num aumento das CIM, mais acentuada a cada aumento da concentração de clorexidina, irreversível no caso da exposição repetida e da exposição única a 0,0001%, mas reversível no caso da exposição única às concentrações de 0,00025% e 0,0005%. Assim, tanto a concentração de clorexidina (Ekizoğlu et al., 2016) como a duração da exposição (Thomas et al., 2000) parecem ser decisivas no desenvolvimento de tolerância/resistência à clorexidina. No estudo de Thomas et al. (2000) foi também avaliada a suscetibilidade de uma estirpe de *E. coli* à clorexidina que, ao contrário da estirpe de *P. aeruginosa*, não mostrou qualquer diminuição de suscetibilidade significativa quer na exposição a concentrações residuais crescentes, quer na exposição repetida à concentração de 0,00001%. Morrissey et al. (2014) apresentaram uma hipótese curiosa quanto ao aumento da tolerância à clorexidina e outros biocidas que admite que a ausência de resistência a esses biocidas, aparentemente observada, pode estar relacionada com o facto de serem utilizados há largas décadas, o que pode ter resultado na substituição total das populações de microrganismos suscetíveis por outras menos suscetíveis/mais tolerantes, num constante aumento global da resistência intrínseca desses microrganismos, neste caso, à clorexidina. Se esta hipótese se confirmasse traria implicações potencialmente maiores quanto

à utilização da clorexidina, que mesmo assim são já apontadas pelos muitos estudos que avaliam a prevalência dos genes *qacA/B* – ou outros, como genes *smr* – e a suscetibilidade à clorexidina de várias estirpes e espécies bacterianas suscetíveis e/ou resistentes a determinados antibióticos.

4.4.2. Suscetibilidade *versus* resistência à polihexanida

Não existem quaisquer evidências de “tolerância cruzada” entre a clorexidina e a polihexanida (Renzoni et al., 2015) e pensa-se que os mecanismos de efluxo não afetem tanto a polihexanida (Moore et al., 2008). A exposição de várias espécies bacterianas a concentrações residuais de polihexanida tem sido avaliada pontualmente (Forbes, Dobson, Humphreys & McBain, 2014; Moore et al., 2008). No estudo de Moore et al. (2008), a polihexanida foi o antisséptico para o qual se verificou a menor frequência de diminuição de suscetibilidade, tendo a clorexidina feito também parte dos antissépticos avaliados; no de Forbes et al. (2014), o aumento de tolerância à polihexanida foi maioritariamente reversível, embora nalguns casos apenas parcialmente. A suscetibilidade da espécie *S. aureus*, incluindo estirpes resistentes à meticilina, parece não ser muito afetada pela exposição a concentrações subterapêuticas deste antisséptico, mas há alguns registos de diminuição de suscetibilidade noutras espécies de estafilococos, embora reversíveis ou parcialmente reversíveis (Forbes et al., 2014; Moore et al., 2008; Renzoni et al., 2015; Wiegand, Abel, Ruth & Hipler, 2012). Ainda assim, no estudo de Cowley et al. (2015), no qual se averiguou o papel da formulação de diversos antissépticos na “frequência, magnitude e reversibilidade de alterações de suscetibilidade por exposição repetida”, houve diminuição de suscetibilidade da espécie *S. aureus* à polihexanida, sobretudo evidente com a solução aquosa pura. A formulação usada pode ter alterado grandemente a atividade da polihexanida relevante para a prática clínica, pois foi pensada para mimetizar a sua utilização como desinfetante. Forbes et al. (2016) avaliaram o efeito da formulação de vários antissépticos na suscetibilidade de alguns microrganismos a antibióticos selecionados, nomeadamente ampicilina, canamicina, cefalotina, ciprofloxacina e tetraciclina e a diminuição da suscetibilidade foi mais comum em estirpes com algum grau de diminuição de suscetibilidade a outros antissépticos que não a polihexanida. Na espécie *S. aureus* houve uma diminuição da suscetibilidade à ampicilina e à ciprofloxacina e um aumento de suscetibilidade à tetraciclina após exposição repetida à solução aquosa pura, que se verificou similarmente para a clorexidina; com a exposição repetida à preparação com surfactantes houve uma diminuição de suscetibilidade à ciprofloxacina. Porém, nenhuma das alterações se traduziu numa resistência à polihexanida.

4.4.3. Falha terapêutica – papel dos antissépticos utilizados

Embora a grande maioria dos doentes no projeto tenha atingido a cura citológica, houve alguns doentes para os quais isso não se verificou e, ainda que se possam listar outros eventuais fatores na origem de uma fraca resposta ao tratamento, os fatores que estão diretamente relacionados com a suscetibilidade aos antissépticos utilizados têm necessariamente de ser considerados. Tendo em conta as bactérias isoladas é altamente improvável que as falhas terapêuticas observadas tenham tido origem em fenómenos de resistência intrínseca a estes antissépticos. Qualquer um dos outros fenómenos não pode ser excluído. Teria sido importante avaliar a suscetibilidade dos isolados aos produtos utilizados, incluindo eventuais flutuações de suscetibilidade com a exposição prolongada a concentrações residuais e reversibilidade das potenciais diminuições de suscetibilidade. Uma diminuição de suscetibilidade pode ter sido mais provável no doente n.º 13 que foi aquele com um período de tratamento mais longo. Não se sabe de que forma varia a concentração destes antissépticos nos locais de aplicação, entre aplicações, em especial num período prolongado de algumas semanas. A concentração residual ao longo do tempo será quase certamente diferente e pode especular-se se a rotina do tratamento pode induzir uma rotina de exposição a concentrações subterapêuticas, residuais e se entre as aplicações pode ocorrer todo um leque de concentrações entre a concentração inicial e zero, que a dado momento permita a adaptação fisiológica dos microrganismos (McBain & Gilbert, 2001). Quanto à clorexidina poderá ser também relevante averiguar exposições prévias e próximas no tempo, por exemplo através da utilização regular de champôs medicamentosos ou de outras preparações, que possam justificar uma eventual diminuição de suscetibilidade dos microrganismos. A utilização de certas preparações com concentrações de clorexidina muito baixas pode ser discutível perante os potenciais problemas associados à exposição a concentrações subterapêuticas e residuais, todavia é necessário avaliar o impacto concreto da utilização dessas preparações na espécie *S. pseudintermedius*. A revisão dos registos do doente n.º 13 revelou a utilização regular de champôs medicamentosos, incluindo champôs de clorexidina, um dos quais tinha sido iniciado um mês antes da entrada no projeto. É ainda importante referir que a potência da clorexidina pode ter sido afetada pela diluição efetuada, que pode ter tornado a preparação mais instável e consequentemente ter resultado numa menor eficácia (Lloyd, 2011a).

4.5. ALGUMAS LIMITAÇÕES E ASPETOS A MELHORAR

4.5.1. Critérios de elegibilidade

Há três aspetos a considerar quanto aos critérios de elegibilidade: a falta de alguns critérios de exclusão importantes; falhas na verificação da elegibilidade dos doentes; e critérios de inclusão

demasiado abrangentes. Alguns *dropouts* teriam sido evitados à partida através de uma melhor seleção dos doentes. A doente n.º 3 foi um desses casos, pois saiu do projeto por escolha voluntária da pessoa responsável ao 7.º dia de tratamento. Esta doente tinha história recente de carcinoma mamário de grau III com metastização para os linfonodos retromamários e mastocitoma de grau II de malignidade e tinha iniciado mitoxantrona três semanas antes da inclusão no projeto – no grupo P – tendo sido administrada uma segunda dose um dia depois da inclusão. A infeção era crónica/recorrente e a doente manifestava prurido intenso e uma otite bacteriana concomitante. A cura citológica foi atingida no espaço de uma semana, tanto na região inguinal como na interdigital, contudo não se observaram melhorias notórias no *score* clínico ou no grau de prurido. A pessoa responsável pela doente demonstrou uma grande ansiedade durante a consulta de reavaliação não só pelo estado geral da doente, mas também pela falta de um antibiótico. Assim, a doente foi retirada do projeto. Esta situação demonstra que é arriscado incluir estes doentes neste tipo de estudos devido à carga emocional envolvida e que pode comprometer não só a adesão à terapêutica como a própria permanência destes doentes nos projetos quando não há resultados imediatos. Nesta situação particular pretendia-se evitar uma sobrecarga da doente com fármacos pela via oral, sobretudo porque havia já registo de alguns episódios de vômito, mas não era viável mantê-la no projeto. Os antibióticos são tidos como as melhores armas no combate às infeções bacterianas – e são, de facto, cruciais – pelo que se compreende que, numa situação tão delicada e grave, existisse um grande receio quanto a um tratamento em fase de estudo clínico preliminar que, neste caso particular, não produziu grandes resultados visíveis em poucos dias. Houve, na verdade, uma ligeira melhoria clínica, mas esta só foi reconhecida – ou admitida – no final da consulta, após a confirmação de que seria prescrito um antibiótico, neste caso cefalexina. Embora a estagiária não tenha assistido à consulta seguinte – 12 dias depois – ficou registado na ficha clínica que havia evidência de infeção bacteriana por cocos e bastonetes e que o antibiótico não estaria a atuar plenamente devido ao aumento da frequência de vômito/regurgitação. É ainda expectável que a doença oncológica introduza uma série de fatores de variabilidade adicionais, muitos deles desconhecidos, que dificultam muito a interpretação dos resultados. A inclusão de doentes oncológicos neste tipo de ensaios clínicos deve, pois, ser evitada, tal como deve ser evitada a inclusão de doentes com qualquer outra doença sistémica grave e/ou debilitante. Este estudo incluiu alguns doentes com endocrinopatia, um deles em processo de diagnóstico. As doenças endócrinas estão muito associadas a infeção cutânea no cão, portanto seria importante incluir estes doentes no projeto. A evolução clínica da doente n.º 14 permitiu encontrar um problema importante que se prende com a avaliação da resposta ao tratamento específico da infeção num doente com lesões de pele crónicas derivadas de um desequilíbrio hormonal. Nesta doente, a

cura citológica foi atingida logo ao 10.º dia e assim se manteve até ao final do tratamento, mas o *score* clínico não foi grandemente alterado, aliás, comparando T0 e T3 manteve-se igual. Uma vez iniciado o tratamento para o hipotireoidismo, a resolução das lesões cutâneas é morosa – e algumas lesões podem não resolver completamente. Miller et al. (2013) indicam um período aproximado de 4 semanas para que as primeiras alterações comecem a ser perceptíveis e podem ser necessários alguns meses – 3 a 4 para a maioria dos doentes – até à resolução completa das lesões; o mesmo para as lesões cutâneas de hiperadrenocorticism. A doente n.º 14 estava sob investigação diagnóstica na altura em que foi incluída no projeto e confirmou-se, mais tarde, a dupla existência de hipotireoidismo e hiperadrenocorticism. Não seria de esperar, portanto, que as lesões crónicas de alopecia resolvessem em poucos dias, pelo que é normal que não tenha havido uma alteração notória do *score* clínico, nem tal deveria ter sido esperado. Há, portanto, que considerar qual a solução mais razoável para este problema: pode acrescentar-se um critério de exclusão para doença endócrina e lesões crónicas de alopecia neste tipo de ensaios clínicos, pois nestas situações a escala utilizada não consegue traduzir a real progressão da resposta ao tratamento, que seria provavelmente a “solução” mais sensata; ou pode ser aplicado um método de avaliação diferente para este grupo de doentes – sobretudo baseado na progressão citológica – sendo efetuada uma análise de eficácia específica para este grupo a par com a análise principal relativa aos doentes sem lesões crónicas de alopecia por alteração hormonal, o que poderia ser viável em amostras consideravelmente maiores ou num estudo que incidisse no tratamento de infeções cutâneas neste grupo de doentes. A questão da correta verificação da elegibilidade dos doentes foi já brevemente abordada a respeito do doente n.º 1 (ponto 4.2.3), mas há que realçar a importância da disponibilidade. O problema dos *dropouts* surge sempre destacado como um fator a considerar no delineamento experimental e, ainda, na análise de resultados de ensaios clínicos. Porém, parece haver uma falha implícita à generalidade dos critérios de elegibilidade, que permitem a inclusão de doentes que seriam provavelmente excluídos depois de ponderada a real disponibilidade das pessoas. Parece, por isso, lógico e importante incluir nos critérios de exclusão algo semelhante a “disponibilidade muito condicionada” ou “pouca disponibilidade (de tempo/emocional)”, pois isto obrigaria a uma avaliação concreta sobre este fator: qual a disponibilidade para efetuar o tratamento diário e comparecer a consultas numa base semanal ou quinzenal; qual a probabilidade de se ausentar durante o período de tratamento e seguimento; entre outras razões que possam pôr em causa a permanência do doente no estudo. Todos estes fatores foram analisados, mas provavelmente não lhes foi dada a importância necessária. Seria também uma oportunidade para incutir nas pessoas a importância da entrada num projeto de investigação e as implicações das perdas de seguimento. Embora o primeiro ponto tenha sido falado neste projeto e muitas pessoas reconheçam o valor da investigação científica, o segundo

ponto nunca foi abordado. Contudo, este pode e deve ser um aspeto a melhorar e reflete, por exemplo, a situação da doente n.º 7 – do grupo P – que não compareceu a qualquer das consultas de avaliação após a consulta de inclusão no projeto. Por contacto telefónico, a responsável pela doente informou que o tratamento tinha “resultado e que a doente estava ótima”. Nesta situação falharam, portanto, duas coisas: a identificação de uma situação de indisponibilidade que levaria a que a doente não fosse incluída e, considerando a sua inclusão, uma correta discussão da importância de comparecer às consultas e das consequências de não o fazer. Infelizmente, não foi possível analisar a progressão desta aparente resposta positiva ao tratamento e a contribuição da participação para a investigação foi praticamente nula. Finalmente, no que respeita a critérios de inclusão demasiado abrangentes considera-se que, no presente trabalho, foi talvez prejudicial a inclusão de doentes com dermatite por *Malassezia*, o que contribuiu essencialmente para uma maior variabilidade da amostra, que se pretende evitar. Noutros estudos no tratamento de piодermite, um dos critérios de exclusão habituais é, efetivamente, a presença de dermatite por *Malassezia* (Borio et al., 2015; Curtis et al., 2006; Loeffler et al., 2011; Murayama et al., 2010b), mas após considerável ponderação decidiu-se incluir estes doentes no projeto devido: à necessidade de reunir um número satisfatório de doentes no período disponível; ao facto de os doentes com piодermite apresentarem, frequentemente, infeção concomitante por leveduras; e porque a própria infeção por leveduras é, por si só, interessante e relevante. Com efeito, se a amostra tivesse sido bastante maior, a inclusão destes doentes não teria constituído problema.

4.5.2. População de estudo

Este projeto pretendeu incluir doentes da consulta de Medicina Geral, de primeira opinião, e doentes da consulta de referência de Dermatologia. Porém, somente um doente foi encaminhado para o projeto a partir da consulta de primeira opinião, a doente n.º 9, que traduzia, mesmo assim, uma situação clínica algo complexa e pouco habitual.

O facto de a amostra ser essencialmente constituída por doentes da consulta de referência foi uma das maiores limitações deste projeto e contribuiu, muito provavelmente, para uma subestimação da eficácia do tratamento quer com a clorexidina quer com a polihexanida. Os doentes presentes à consulta de referência de Dermatologia apresentam, muitas vezes, situações mais problemáticas e difíceis de gerir em virtude da cronicidade e/ou gravidade do problema; possuem normalmente vários fatores predisponentes para infeção e um extenso historial de falhas terapêuticas e/ou infeções crónicas/recorrentes. A doente n.º 4, o doente n.º 13 e a doente n.º 16 refletem esse panorama de forma flagrante. A primeira tinha hipotireoidismo e dermatite atópica, apresentando otite crónica e persistente por leveduras *Malassezia* e infeções cutâneas recorrentes na face, na zona ventral do corpo e na região interdigital. Esta doente tinha alergia

a leveduras *M. pachydermatis* – confirmada por provas alergológicas cutâneas – o que contribui para o difícil controlo da sua dermatite atópica e para o desenvolvimento de infeções cutâneas. O doente n.º 13 representa outro caso de difícil controlo da dermatite atópica: mesmo com imunoterapia de 3 em 3 semanas, ciclosporina diária e banhos regulares com champôs medicamentosos sempre necessitou de períodos frequentes de corticosteroides por via oral e manteve essa necessidade com o oclacitinib, que iniciou recentemente e o qual parece não ter tido um grande impacto na sua qualidade de vida. A doente n.º 16 tinha uma história clínica rica em infeções cutâneas recorrentes e fraca resposta ao tratamento com antibióticos aparentemente adequados. A violação de protocolo terapêutico observada – aplicação tópica de aceponato de metilprednisolona nas lesões, após agravamento do prurido por interrupção de toda a medicação – pode indicar que as falhas terapêuticas no passado possam ter resultado, pontualmente, de quebras idênticas na adesão à terapêutica.

No caso particular destes projetos é, assim, importante desenvolver uma melhor ponte entre a consulta de Medicina Geral e a consulta de referência de Dermatologia, o que passa não só pela criação de diferentes materiais e ferramentas de divulgação do projeto, mas também pela sensibilização e formação sobre a matéria em causa, o que adicionalmente é sempre uma mais-valia para todos.

4.5.3. Protocolo de tratamento

Apesar das limitações inerentes a este projeto foi possível identificar vários aspetos a melhorar no protocolo de tratamento. Ainda não há estudos clínicos suficientes que permitam definir o protocolo de tratamento ideal para cada situação, i.e. para cada tipo de infeção cutânea. Essa necessidade foi já reconhecida por Hillier et al. (2014), ainda que especificamente dirigida ao tratamento da foliculite bacteriana superficial. A duração, modo e frequência de aplicação ideais são parâmetros a definir e todos esses fatores podem influenciar de forma negativa ou positiva a resposta ao tratamento tópico. A recomendação desses autores é que o tratamento tópico da foliculite bacteriana superficial seja continuado até 7 dias após a resolução das lesões cutâneas associadas à infeção, que o tempo de contacto seja de, no mínimo, 10 minutos e que a pelagem dos doentes seja mantida curta para assegurar um contacto total dos antimicrobianos com a pele. No estudo de Borio et al. (2015), o tratamento tópico com digluconato de clorexidina a 4% foi efetuado durante 4 semanas e, embora os autores não indiquem a que momento se deu a resolução clínica ou citológica da infeção de cada doente, sabe-se que todos os doentes que completaram o estudo não tinham quaisquer sinais de infeção aos 28 dias de tratamento, quer no grupo de tratamento tópico, quer no grupo de tratamento com antibiótico por via oral; 20% dos doentes no grupo de tratamento tópico (5/25) e 31% daqueles no grupo de tratamento

sistémico (5/16) tinham sinais clínicos compatíveis com infeção na consulta final aos 28 dias após a conclusão do tratamento, mas os autores acharam pouco provável que fossem recidivas. No estudo de Loeffler et al. (2011), o tratamento com gluconato de clorexidina a 3%, durante 22 dias, resultou na resolução da infeção em 30% dos doentes e numa grande melhoria em 40% dos doentes (em N=10); em 30% a melhoria foi fraca ou não houve qualquer alteração. Em ambos os estudos, o champô foi aplicado duas vezes por semana, mas o tempo de contacto no estudo de Loeffler et al. (2011) foi de 10 minutos vs. os 3 a 5 minutos de Borio et al. (2015), que por seu lado usaram uma concentração de clorexidina maior (4% vs. 3%) e o complemento da solução pulverizada nos restantes dias. Um tempo de contacto de 10 minutos pode ser muito difícil de concretizar para a maioria das pessoas, portanto um protocolo em que esse tempo possa ser reduzido pode ser consideravelmente mais viável e, portanto, beneficiar a *compliance*, mesmo que implique a aplicação diária de uma solução de lavagem. De facto, Banovic et al. (2013) mostraram que a clorexidina é capaz de eliminar *S. pseudintermedius*, *P. aeruginosa* e *M. pachydermatis* em apenas 3 minutos e a concentrações substancialmente menores que aquela utilizada por Borio et al. (2015). No estudo de Murayama et al. (2010b), nenhum doente atingiu a cura clínica com apenas duas aplicações de um champô de clorexidina numa única semana de tratamento, independentemente da concentração e do sal utilizado, mas no protocolo de dois banhos por semana durante duas semanas, com o champô de acetato de clorexidina a 2%, 62,5% dos doentes (n=5, em N=8) atingiram a cura clínica. Todavia, globalmente, os autores indicaram que 25% dos doentes nesse protocolo e 40% dos doentes no protocolo de apenas uma semana não mostraram qualquer melhoria clínica (Murayama et al., 2010b).

No início do tratamento da doente n.º 11 o protocolo foi mal compreendido e a clorexidina foi aplicada duas vezes por dia. Tendo em conta a pequena alteração e estando prevista a revisão do protocolo no caso de agravamento clínico para corrigir eventuais erros de perceção desta dimensão, não se considerou que tivesse ocorrido violação grave do protocolo, portanto esta doente continuou no projeto. Pensa-se que esta alteração accidental na frequência de aplicação tenha contribuído para a rápida cura citológica nesta doente, que se observou logo ao 10.º dia. O protocolo utilizado neste trabalho foi eficaz para alguns doentes e, provavelmente, teria sido mais eficaz não fosse a natureza da amostra. É de explorar, efetivamente, em que situações é que um protocolo tão simples pode ser suficiente e em que situações é necessário um protocolo diferente. Não obstante a necessidade de definir protocolos de tratamento tópico específicos para cada tipo de infeção – e de grupos de doentes – há alguns aspetos importantes a considerar num futuro protocolo de tratamento com estes antissépticos: a aplicação exclusiva das soluções de lavagem, i.e. sem utilização simultânea de champôs medicamentosos, será provavelmente mais eficaz se efetuada duas vezes por dia (e não uma vez por dia), numa base diária; no caso

das piodermites superficiais e tendo em conta o estudo de Borio et al. (2015) é de ponderar que a duração do tratamento seja definida numa base fixa de quatro semanas, i.e. 28 dias; é também de ponderar prolongar a utilização do antisséptico após a resolução das lesões, como indicado por Hillier et al. (2014) para a foliculite bacteriana superficial; no caso das piodermites de superfície pode ser necessário um período de tratamento consideravelmente menor e talvez não faça sentido prolongar a exposição ao antisséptico para lá da resolução das lesões; e no caso de múltiplas regiões corporais afetadas, deve ponderar-se a utilização concomitante de champôs medicamentosos, complementada com a solução de lavagem, como no estudo de Borio et al. (2015). A limitação principal da polihexanida é que não existem champôs com esta substância ativa de base, como acontece com a clorexidina, o que para já limita a averiguação de protocolos que pretendam incluir champôs medicamentosos.

4.5.4. Escalas de avaliação utilizadas

Ao contrário daquilo que, por exemplo, se verifica para a avaliação clínica dos doentes com dermatite atópica (Olivry et al., 2014), não existe ainda uma escala objetiva, validada e universalmente utilizada para avaliação clínica dos doentes com infeção cutânea. A inexistência de uma tal escala levou à necessidade de rever as escalas previamente elaboradas por diferentes autores em estudos ou contextos semelhantes. Pouco após o início do projeto constatou-se que a escala produzida não era suficiente para um registo prático das lesões, que permitisse, com facilidade, anotar também algumas informações adicionais diretamente associadas a uma lesão específica localizada numa região específica, pelo que foi adicionado um espaço para a sua representação visual, como é aliás reforçado por vários autores, entre os quais Miller et al. (2013). Em termos gerais, a escala criada não se desvia grandemente de outras escalas revistas, mas foi pensada de forma a reunir a informação relevante de forma precisa, correta e rápida, pelo que se destina a uma avaliação global do doente e não a uma avaliação exaustiva e impraticável como era o caso do CADESI-3, que motivou a criação do CADESI-4 (Olivry et al., 2014). Considerando a esperada variabilidade de apresentações clínicas era também muito importante ter uma escala versátil, mas o menos dúbia possível, que permitisse avaliar as lesões. Contrariamente à dermatite atópica, as piodermites não têm uma distribuição lesional específica e tendo em conta o tipo de projeto considerou-se que seria mais viável avaliar a distribuição e gravidade das lesões *per se* e não por regiões corporais, como sucede no CADESI-4 ou na escala utilizada por Curtis et al. (2006), que, por conseguinte, podem atingir *scores* de 180 e 216, respetivamente. No estudo mais recente de Borio et al. (2015), os autores também não utilizaram um sistema de pontuação por regiões corporais, tendo simplesmente caracterizado as lesões *per se*. A escala utilizada no presente trabalho foi principalmente baseada na de Curtis

et al. (2006), com a modificação de Murayama et al. (2010b) no que respeita à descrição das quatro categorias de pontuação, sendo uma mistura das duas nesse aspeto, embora muito diferente de Murayama et al. (2010b) no que respeita ao número e tipo de lesões avaliadas. O facto de o sistema de pontuação não se basear em regiões corporais pode fazer com que a sua forma de aplicação seja pouco perceptível para quem não esteja familiarizado com a sua utilização: por exemplo, podem surgir dúvidas quando o mesmo tipo de lesão ocorre em diferentes regiões corporais com diferentes graus de gravidade quanto ao seu aspeto. É, pois, importante que se entenda esta escala como uma ferramenta de avaliação global, ou seja, ponderando todas as lesões e fazendo um sumário da situação do doente. Ainda assim, as categorias para atribuição de pontos têm também em conta a distribuição global das lesões, pelo que não será, em princípio, difícil atribuir a cada lesão a devida pontuação, sem dúvidas maiores. Este fator pode, todavia, aumentar a subjetividade da escala, ainda que exista sempre algum grau de subjetividade associado a este tipo de escalas. Embora não tenha sido relevante para o presente estudo, porque não houve muitos doentes com esse tipo de lesão, pensa-se que a hiperpigmentação deveria ter sido incluída na lista de lesões a avaliar, não só por ser relativamente frequente nas piодermites mas também por ser comum na dermatite por *Malassezia*. Por outro lado, há que ter em conta aquilo já discutido a propósito dos critérios de elegibilidade deste projeto. No estudo de Borio et al. (2015) foram somente avaliados cinco tipos de lesões – pápulas, pústulas, colaretes, crostas e alopecia – mas os autores não incluíram doentes com dermatite por *Malassezia*. Além disso, a liquenificação, que foi registada em dois doentes deste projeto, deverá ser incluída numa escala que pretenda avaliar doentes com dermatite por *Malassezia*, tal como no estudo de Maynard et al. (2011). A escala foi elaborada considerando que apenas seriam incluídos doentes com infeção bacteriana, associada ou não a sobre crescimento de leveduras e, ainda que a inclusão de doentes com dermatite por *Malassezia* em exclusivo tenha sido ponderada e permitida pouco depois do início do período de inclusão, não foi alterada por motivos óbvios. Considera-se que a falta destes dois tipos de lesões na escala de avaliação não teve, contudo, qualquer influência nas conclusões relativas a este grupo de doentes, mas poderia ter tido se a amostra tivesse sido consideravelmente maior. Ainda no que respeita aos tipos de lesões avaliados, há uma importante consideração a fazer. Quase todos os doentes apresentavam eritema em T0 (94,7%) e a sua evolução foi subsequentemente registada, mas este tipo de lesão revelou não ser um bom indicador da evolução do tratamento específico da infeção, pelo menos neste grupo de doentes, maioritariamente doentes com dermatite atópica não controlada e, logo, inflamação associada a prurido. No caso do doente n.º 5, por exemplo, na reavaliação de T2, ao 16.º dia de tratamento, havia já cura citológica, mas o *score* clínico tinha descido apenas 1 ponto em relação a T0 e tinha-se mantido inalterado em

relação a T1 devido à presença de eritema moderado. Para além disso, a ciclosporina tinha sido interrompida entre T1 e T2 devido a um episódio de gastroenterite, pelo que o doente ficou mais desconfortável nessa altura, o que pode, pois, ter contribuído para manter o eritema nesse período. Já em T3, ao 23.º dia de tratamento, o *score* clínico estava idêntico a T0, tendo a clorexidina sido, nesta altura, interrompida e iniciada a aplicação de uma pomada de aceponato de metilprednisolona; uma semana depois, o *score* clínico tinha descido 3 pontos (de 5 para 2). Outro exemplo é a doente n.º 12 que, sem qualquer evidência de infeção na região axilar desde T2, i.e. desde o 17.º dia de tratamento, apresentava inflamação em T3, ao 23.º dia, que resolveu numa semana com a aplicação de aceponato de hidrocortisona, muito embora o *score* clínico se tenha mantido inalterado devido a nova infeção na região interdigital. O eritema foi também avaliado por Curio et al. (2006) e Murayama et al. (2010b), contudo os autores parecem não ter incluído doentes com dermatite atópica ou qualquer outro tipo de alergia.

Tal como acontece com a avaliação das lesões cutâneas, também não há uma escala consagrada para a avaliação do exame citológico nestes doentes. Ainda assim, Budach e Mueller (2012) propuseram um método semiquantitativo, para avaliar a citologia cutânea, que é muito razoável para utilização prática nas consultas e foi utilizado no estudo de Borio et al. (2015). Embora os autores não indiquem mais do que uma escala para avaliar cada categoria proposta, dado que a soma das pontuações individuais numa pontuação global é o sistema utilizado para as escalas de *score* clínico, efetuou-se inicialmente a soma da pontuação das seis categorias consideradas. Contudo, após reflexão, concluiu-se que, uma vez que a presença de células inflamatórias não significa necessariamente infeção, a soma da pontuação das seis categorias poderia adulterar grandemente a perceção sobre a evolução do tratamento específico da infeção. Isto foi discutido com um dos autores aquando da análise estatística, no sentido de encontrar a melhor forma de aplicar o método descrito para o contexto do trabalho. Uma vez que era expectável que ambos os antissépticos utilizados exercessem ação contra cocos, bastonetes e leveduras (Banovic et al., 2013; Cheung et al., 2012; Fabry & Kock, 2014; Fabry et al., 2014; Hübner & Kramer, 2010; Karpicki & Szkaradkiewicz, 2015; Lee et al., 2004; Miller et al., 2013), a soma das pontuações relativas a essas três categorias faria sentido e seria, em princípio, sensível (R.S. Mueller, comunicação pessoal, 13 de junho, 2016). A pontuação atribuída a cada categoria está, todavia, especificada no Anexo 17, pois o autor sugeriu também que essa informação estivesse disponível. A análise estatística foi somente efetuada para o *score* citológico global, no entanto, em projetos futuros deveria ser explorada a evolução particular de cada uma das categorias. No estudo de Borio et al. (2015), o exame citológico teve apenas em conta a presença ou ausência de bactérias e o número de bactérias fagocitadas por neutrófilos, pelo que o método de Budach e Mueller (2012) foi aplicado a uma única categoria: “bactérias intracelulares”. Uma vez que

esses autores incluíram apenas doentes com piodermites superficiais, faz sentido que avaliem apenas a evolução da presença e número de bactérias intracelulares, mas no presente trabalho estava também prevista a inclusão de doentes com piodermites de superfície e era importante, portanto, poder incluir uma avaliação da quantidade de bactérias extracelulares. Ainda assim, pensa-se que esta forma de avaliação possa ter criado algum viés no *score* citológico, que não será significativo para as conclusões retiradas deste grupo de doentes, mas que se deverá ter em conta num projeto de maiores dimensões, especialmente se forem incluídos doentes com vários tipos de infeção. Seria benéfico que o utilizador estivesse familiarizado com o método utilizado, o que aconteceria se este método fosse já habitual na prática clínica. É, portanto, de ponderar a introdução desta ferramenta na consulta de referência de Dermatologia para melhor avaliar a sua fiabilidade e, adicionalmente, permitir uma utilização mais ágil quando necessária em investigação clínica relacionada com infeções cutâneas. Budach e Mueller (2012) indicam, inclusive, que este método semiquantitativo pode ser recomendado para a monitorização do tratamento antimicrobiano na prática clínica diária.

4.5.5. Planeamento do desenho experimental

No que respeita aos métodos de recolha dos dados, a recolha dos dados para citologia cutânea representou alguns problemas. Geralmente, há necessidade de recolher mais que uma amostra por doente para exame citológico, mas no planeamento do ensaio clínico não se teve a perceção dos problemas que esse fator poderia criar e, para efeitos do tipo de projeto, a decisão de utilizar a amostra potencialmente mais relevante pareceu adequada. No futuro deverá ser ponderada a inclusão das amostras de todas as regiões envolvidas para a análise da progressão citológica e o melhor método de maximizar o potencial informativo dos dados dentro do bom senso clínico. Considera-se que o tamanho da amostra (N=19) ficou aquém do necessário para um correto poder do estudo, que deverá ser igual ou superior a 80%, sob o risco de um efeito real não ser detetado (Sakpal, 2010). A amostra foi ainda reduzida pela alta taxa de *dropouts*, que deve ser minimizada futuramente e é um dos aspetos importantes a considerar no planeamento.

4.6. OUTRAS CONSIDERAÇÕES

4.6.1. Concordância entre observadoras

Há algumas reticências quanto ao método mais fidedigno para verificar a concordância entre observadores quando os pares de observações incluem medições repetidas de vários doentes (Bland & Altman, 2007). No caso particular deste ensaio clínico, não só os 35 pares de *scores* avaliados incluíam repetições, como também não havia um n.º fixo de observações por doente, pois nem sempre houve possibilidade de ambas as observadoras fazerem esse registo em todas

as avaliações de todos os doentes. O facto de a escala de pontuação para atribuir o *score* clínico assumir valores discretos também colocou algumas dúvidas quanto à forma mais adequada para analisar estes dados, mas a análise que tem em conta as repetições terá sido a mais adequada. Segundo Bland e Altman (2007) é sempre preferível um método que tenha em consideração a estrutura dos dados, ainda que neste caso essa análise tenha produzido resultados idênticos à análise que tratou os 35 pares de *scores* como independentes entre si, o que pode acontecer quando o n.º de pares repetidos por doente é muito reduzido e inferior ao n.º total de doentes na amostra. A análise com a média das observações de cada doente é mais adequada quando a própria medição clínica é também uma média de um certo n.º de observações (Bland & Altman, 2007). Existiu, de facto, um viés entre as observadoras. A interpretação do teste de Wilcoxon deve ser feita com cuidado devido aos dados serem discretos, mas vem ao encontro do gráfico Bland-Altman (Figura 19). Curiosamente, estes autores consideram que os testes de hipóteses são de pouca ajuda na verificação de concordância entre métodos ou observadores, porque o mais importante é quantificar o viés – para se poder determinar a sua relevância prática – e não apenas saber se existe ou não um viés (Bland & Altman 1999). Os pontos na Figura 19 estão dispersos de forma aleatória em torno do viés estimado e não se detetam quaisquer padrões na sua distribuição que indiquem que o viés seja diferente para diferentes magnitudes de *score* clínico. Quanto ao intervalo dado pelos limites de concordância sabe-se que, em princípio, quanto mais estreito for maior será a concordância entre os observadores. Em última análise, contudo, é a ponderação da relevância clínica desse intervalo que indica se se pode considerar que existe concordância suficiente para que as medições de um ou de outro possam ser usadas indiferentemente (Bland & Altman, 2003). No caso particular da estagiária e da orientadora pode dizer-se que, sim, há concordância suficiente entre ambas, uma boa concordância. O viés estimado parece constante e independente da magnitude do *score* e os limites de concordância são razoáveis para o tipo de escala utilizada, ou seja, considera-se que o viés não é clinicamente significativo. O valor máximo passível de ser atingido nessa escala é de 24 pontos, valor esse resultante da soma da pontuação individual de oito tipos de lesões classificadas de 0 a 3. Isto significa, por exemplo, que uma diferença absoluta de 1 ponto no *score* clínico traduz uma diferença de 1 ponto num dos oito tipos de lesão avaliados. Globalmente, a estagiária parece ter sido mais conservadora na avaliação do eritema, tendo sido frequente atribuir mais 1 ponto do que a orientadora, embora nem sempre se tenha verificado. Houve algumas atribuições em que a estagiária deu mais 1 ponto no eritema e menos 1 nas pápulas e, mesmo assim, o *score* global foi idêntico. É provável que isto traduza a inexperiência da estagiária, pois pequenas pápulas eritematosas podem passar despercebidas numa zona já eritematosa e a avaliação do eritema é intrinsecamente subjetiva, mesmo seguindo as indicações visuais já existentes, nomeadamente

no artigo de validação do CADESI-4 (Olivry et al., 2014). O *score* clínico da estagiária foi o *score* utilizado para as avaliações efetuadas e segundo esta análise as conclusões clínicas seriam muito provavelmente as mesmas se tivesse sido antes utilizado o *score* da orientadora.

4.7. PROBLEMAS DAS INFECÇÕES CUTÂNEAS

4.7.1. Para o doente

As infecções cutâneas não só traduzem, grande parte das vezes, alterações subjacentes na saúde como trazem um grande desconforto ao doente, tendo um grande impacte na sua qualidade de vida. Em situações extremas, com infecções arrastadas que se alastraram profundamente na pele, há também alterações sistémicas. É, pois, necessário instaurar uma terapêutica antimicrobiana atempada e sobretudo adequada. As considerações que se possam fazer quanto aos problemas da resistência aos antimicrobianos em Medicina Humana têm o potencial de se verificar em Medicina Veterinária. Assim, a infeção por microrganismos multirresistentes poderá ser complicada de gerir, implicando para os doentes um tratamento mais prolongado e com maior potencial para falha terapêutica, que envolve consultas de seguimento frequentes, muitas vezes, uma abordagem com várias frentes de ação, em que a terapêutica tópica deve estar quase sempre incluída e, portanto, acarreta uma necessidade de tolerância do doente a um tratamento globalmente mais “intensivo”. Aquilo que se institui para tratamento específico da infeção, sobretudo em relação aos antibióticos, poderá influenciar a resposta a futuras infeções. Portanto, no que respeita aos benefícios diretos para o doente, faz sentido que se privilegie a utilização de antimicrobianos relativamente inócuos, que traduzam uma boa eficácia e a menor interferência possível com o organismo, como é o caso da polihexanida.

4.7.2. Para aqueles que convivem regularmente com o doente

A transmissão de microrganismos entre cães e pessoas e outros animais na mesma casa tem sido um alvo de investigação crescente, sobretudo perante o agravamento do panorama global das resistências aos antimicrobianos. Song et al. (2013) revelaram que há uma partilha maior da microbiota cutânea em seres humanos da mesma casa quando há um cão nessa casa e que os seres humanos partilham tendencialmente mais microbiota cutânea com os seus próprios cães que com outros cães. Ainda que não se saiba se esta partilha é realmente relevante, os autores alertam para “o contacto direto e frequente entre coabitantes poder modelar significativamente a composição das suas comunidades microbianas”, o que pode ser especialmente relevante na presença de uma infeção cutânea, em particular por microrganismos multirresistentes, como MRSP, MRSA e *E. coli* produtoras de β -lactamases de espetro alargado. A transmissão destas bactérias entre cães e seres humanos na mesma casa pode ocorrer por contacto físico direto,

indiretamente através do meio ambiente ou mediada por outros coabitantes (Davis et al., 2012; Guardabassi, Loeber & Jacobson, 2004). Ademais, há possibilidade de transmissão horizontal de genes que podem conferir resistência (Davis et al., 2012) e o risco parece ser ainda maior no caso de cães com piodermite (Guardabassi et al., 2004; Weese & van Duijkeren, 2010). As infecções por *S. pseudintermedius* nos seres humanos, apesar de pouco comuns, podem ocorrer, sendo sobretudo infecções de pele e tecidos moles (Somayaji, Priyantha, Rubin & Church, 2016). Há quase sempre uma suspeita de que o contacto prévio com cães esteja na origem da infeção (Somayaji et al., 2016; Starlander, Börjesson, Grönlund-Andersson, Tellgren-Roth e Melhus, 2014). Ainda que a transmissão de *S. pseudintermedius*, incluindo MRSP, entre cães e seres humanos resulte sobretudo numa contaminação transitória, há um potencial para colonização e infeção (Davis et al., 2012), que pode ser consideravelmente maior em grupos de risco.

A presença de *M. pachydermatis* na pele de seres humanos é muito “rara e indica transmissão de uma fonte externa” (Chang et al., 1998; Prohic & Kasumagic-Halilovic, 2009), sendo as infecções por estas leveduras muito pouco comuns e sobretudo de carácter invasivo, nosocomial. As referências mais frequentes dizem respeito a fungémias em recém-nascidos, em particular prematuros (Al-Sweih, Ahmad, Joseph, Khan & Khan, 2014; Chang et al., 1998). A suspeita é de que, em algum ponto da cadeia de transmissão, haja contaminação transitória das mãos dos profissionais de saúde envolvidos (Chang et al., 1998). A contaminação/colonização por *M. pachydermatis* das mãos das pessoas que vivem com cães parece ser bastante comum (Morris, O’Shea, Shofer & Rankin, 2005). Apesar de Morris et al. (2005) terem rejeitado a hipótese de que os cães com dermatite por *Malassezia* constituam um risco maior que cães saudáveis, devem ponderar-se algumas recomendações de higiene mais cuidada no caso de pessoas de grupos de risco ou em contacto com grupos de risco (Velegriki et al., 2015).

4.7.3. Para o médico-veterinário

Os problemas que se colocam ao médico-veterinário acabam por ser a soma de todos aqueles já mencionados quanto às potenciais dificuldades do tratamento de infeções cutâneas por microrganismos multirresistentes, sendo importante ter alternativas aos antibióticos – como a polihexanida ou a clorexidina – que permitam não só combater essas infeções de forma eficaz e segura como preservar a viabilidade dos antibióticos existentes, sobretudo quando as opções de tratamento são parcas perante a recomendação para evitar a utilização dos antibióticos de última linha considerados críticos ou muito importantes em Medicina Humana (Lloyd, 2011b); quanto ao potencial zoonótico destes agentes patogénicos, considerando ainda que pode haver um risco acrescido de colonização por MRSA (Loeffler et al., 2010; Moodley et al., 2008) e MRSP, em especial no que respeita aos médicos-veterinários dermatologistas, que tendem a ter

uma exposição frequente a cães com infeções de pele (Morris, Boston, O'Shea & Rankin, 2010; Paul, Moodley, Ghibaud & Guardabassi, 2011); e quanto ao papel interveniente na saúde das pessoas que contactam com o doente de maneira mais ou menos constante e/ou permanente, atentando aos grupos de risco.

5. CONCLUSÕES

A eficácia da polihexanida *in vivo* parece ser pelo menos comparável à da clorexidina, tal como observado *in vitro* por Banovic et al. (2013). Não se registaram quaisquer reações adversas à polihexanida e o protocolo de tratamento foi bem tolerado pelos doentes e responsáveis pelo tratamento, o que está em sintonia com a literatura de Medicina Humana e pode traduzir uma potencial vantagem relativamente à clorexidina, que neste projeto esteve muito provavelmente associada a uma reação adversa num doente, designadamente dermatite de contacto irritativa e/ou alérgica.

Observou-se uma melhoria clínica com a aplicação de polihexanida em 75% dos doentes vs. 60% dos doentes no grupo de tratamento com clorexidina. Houve uma melhoria clínica de pelo menos 50% associada a cura citológica em 50% dos doentes no grupo da polihexanida e 20% daqueles no grupo da clorexidina. Todos os doentes tratados com polihexanida que mostraram uma melhoria lesional quantificada em pelo menos 50% atingiram eventualmente a cura clínica vs. apenas um doente no grupo da clorexidina. A cura clínica, no grupo da polihexanida, ocorreu entre os 14 e 31 dias e observou-se aos 21 dias de tratamento no único e respetivo caso do grupo da clorexidina. A cura citológica foi mais frequente do que a cura clínica em ambos os grupos, ocorrendo entre os dias 7 e 24 do tratamento no grupo da polihexanida e entre os dias 8 e 22 do tratamento no grupo da clorexidina. Os resultados aparentemente menos positivos no grupo da clorexidina estão provavelmente relacionados com as limitações inerentes ao projeto, embora não se possa excluir que algumas das estirpes isoladas pudessem ter algum grau de tolerância à clorexidina. Não foi encontrada qualquer relação entre o perfil de suscetibilidade a antibióticos e a resposta ao tratamento com qualquer um dos antissépticos; de acordo com a citologia, ambos foram eficazes contra estirpes totalmente suscetíveis, resistentes e multirresistentes.

Não se observou qualquer relação entre o tipo de infeção e o tipo de lesões e os indicadores de eficácia, mas não se pode excluir que uma tal relação não exista porque a amostra não tinha um tamanho suficiente para averiguar a influência desses aspetos no tratamento. Da mesma forma, o desfecho particular do único doente com dermatite por *Malassezia* sem piodermite associada é insuficiente para retirar quaisquer conclusões sobre a potencial eficácia da polihexanida nesse tipo de infeção, pois, inclusive, a polihexanida foi eficaz no tratamento de doentes com infeção bacteriana e concomitante dermatite por *Malassezia*.

A verificação de concordância entre a estagiária e a orientadora quanto à atribuição do *score* clínico foi um aspeto curioso, adicional, averiguado no projeto, que contribuiu não só para os primeiros passos na validação de uma possível escala de avaliação de *score* clínico a ser utilizada noutros projetos para avaliação da progressão clínica em doentes com infeção cutânea bacteriana, como, na prática, permitiu avaliar a aquisição de competências/conhecimentos da estagiária em oposição àquilo que foi transmitido e ensinado pela orientadora.

Os resultados obtidos com o Prontosan® solução poderão não ser os mesmos se utilizada outra preparação de polihexanida, tendo em conta a particularidade da formulação com betaína, que está associada a excelentes resultados em Medicina Humana.

Em suma, o projeto teve, quanto a ambas, um balanço positivo: constitui uma contribuição para a investigação de potenciais protocolos de tratamento tópico das infeções cutâneas no cão; dá evidências de eficácia e segurança de uma aparente alternativa de tratamento tópico para infeções bacterianas superficiais no cão, de caráter localizado; e garante uma base orientativa para futuros projetos de investigação associados à utilização da polihexanida na clínica de pequenos animais. Além disso, praticamente todos os participantes ficaram satisfeitos com a entrada no projeto, exceto a participante relativa à doente para a qual houve maior suspeita de reação adversa, que piorou com a clorexidina. Nenhum dos participantes excluiu uma eventual futura participação noutro projeto de investigação a decorrer na FMV-ULisboa.

6. PERSPETIVAS FUTURAS

A eficácia da polihexanida no tratamento de piodermites associadas a dermatite por *Malassezia* garante a investigação futura exclusiva de cada um desses tipos de infeção separadamente e/ou em conjunto.

Em princípio será mais simples averiguar o papel da polihexanida nas infeções exclusivas por leveduras devido à especificidade dessas infeções e a verificar-se um benefício, pode ser interessante avaliar um protocolo com a polihexanida como adjuvante ao tratamento com antifúngico de uso sistémico vs. o mesmo antifúngico em exclusivo e/ou com clorexidina. Como referido atrás, nos doentes com infeção exclusiva por leveduras seria ainda interessante medir o pH cutâneo antes, durante e após o tratamento e analisar a relação com a resposta ao tratamento para se perceber se pequenas alterações de pH são clinicamente relevantes e compreender melhor o papel do pH na dermatite por *Malassezia*.

Os métodos utilizados neste projeto podem ser aplicados num projeto que avalie a polihexanida apenas para o tratamento de foliculites bacterianas superficiais, ou seja, sem sobrecrecimento associado de leveduras *Malassezia*. Seria relevante explorar as várias opções no que respeita aos protocolos de tratamento e também o potencial adjuvante da polihexanida no tratamento de

piodermites generalizadas, como por exemplo um antibiótico de uso sistémico vs. o mesmo antibiótico e tratamento tópico com polihexanida, de forma semelhante ao estudo de Borio et al. (2015). Ademais, seria também interessante avaliar se há diferenças entre a polihexanida e a clorexidina e/ou entre a clorexidina e a iodopovidona na resolução de *hot spots* e qual o protocolo mais eficaz e menos moroso. O mesmo se poderá aplicar aos doentes com intertrigo e pododermatite.

Considerando as características da polihexanida no que respeita à promoção da cicatrização e ao excelente índice de biocompatibilidade e considerando os resultados positivos do presente estudo, devem sem dúvida considerar-se projetos direcionados para a utilização da polihexanida como tratamento adjuvante de piodermites profundas, nas quais o potencial deste antisséptico, tal como é utilizado em Medicina Humana, poderá ser mais notório. Durante o projeto, por algumas circunstâncias, a polihexanida foi dispensada para o tratamento de dois doentes com granuloma acral por lambedura, que não poderiam deixar de ser mencionados, ainda que não pudessem fazer parte do estudo que foi desenvolvido e previsto. Reencaminham-se os leitores, portanto, para o Anexo 17.

Quanto à escala de avaliação da progressão clínica devem ser pelo menos introduzidas as alterações relativas à avaliação objetiva das lesões de hiperpigmentação e liquenificação, especialmente importantes nos doentes com dermatite por *Malassezia*. Além disso, esta escala deve, em princípio, ser reformulada e potencialmente validada e é particularmente importante encontrar uma melhor forma de avaliação da progressão da resposta ao tratamento específico da infeção em doentes com dermatite atópica. A progressão citológica poderá vir a ser mais relevante em alguns doentes do que a progressão do *score* clínico.

Por fim, é de encorajar a avaliação *in vitro* simultânea a par com a avaliação clínica em qualquer um dos potenciais projetos referidos, o que além de poupar recursos no delineamento de outro projeto – i.e. projetos *in vitro* e *in vivo* separados – pode trazer conhecimentos importantes que permitam compreender melhor os efeitos reais do tratamento antisséptico, sendo especialmente importante perceber as potenciais consequências da exposição prolongada dos microrganismos isolados a concentrações subterapêuticas destes antissépticos.

Globalmente é importante que se continue a investir em projetos de investigação direcionados para o tratamento tópico das infeções cutâneas, explorando as várias questões mais ou menos problemáticas e tipos particulares de infeção, com diferentes agentes etiológicos, diferentes protocolos de tratamento e métodos de avaliação da progressão clínica e citológica.

BIBLIOGRAFIA

- Agência Europeia de Medicamentos (1998). *CPMP/ICH/363/96 ICH Topic E 9 Statistical principles for clinical trials: step 5 – note for guidance on statistical principles for clinical trials*. Acedido em jul. 17, 2016. Disponível em: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002928.pdf
- Agência Europeia de Medicamentos (2015). *EMA/CVMP/AWP/401740/2013 Reflection paper on the risk of antimicrobial resistance transfer from companion animals*. Acedido em set. 9, 2016. Disponível em: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2015/01/WC500181642.pdf
- Al-Sweih, N., Ahmad, S., Joseph, L., Khan, S. & Khan, Z. (2014). *Malassezia pachydermatis* fungemia in a preterm neonate resistant to fluconazole and flucytosine. *Medical Mycology Case Reports* [electronic resource], 5, 9-11.
- Ansorg, R., Rath, P.M. & Frabry, W. (2003). Inhibition of the anti-staphylococcal activity of the antiseptic polihexanide by mucin. *Arzneimittel-Forschung*, 53(5), 368-371.
- Bannoehr, J. & Guardabassi, L. (2012). *Staphylococcus pseudintermedius* in the dog: taxonomy, diagnostics, ecology, epidemiology and pathogenicity. *Veterinary Dermatology*, 23(4), 253-266.
- Banovic, F., Bozic, F. & Lemo, N. (2013). *In vitro* comparison of the effectiveness of polihexanide and chlorhexidine against canine isolates of *Staphylococcus pseudintermedius*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Malassezia pachydermatis*. *Veterinary Dermatology*, 24(4), 409-e89.
- Barrows, M. (2007). F10, a novel product range most suited to zoological medicine. *The Facts – a series of international case studies*, (6). Acedido em ago. 2, 2016. Disponível em: http://www.healthandhygiene.co.za/admin_uploads/files/facts/The%20Facts%20Issue%206_2.pdf
- Bassett, R.J., Burton, G.G. & Robson, D.C. (2004). Antibiotic responsive ulcerative dermatoses in German Shepherd Dogs with mucocutaneous pyoderma. *Australian Veterinary Journal*, 82(8), 485-489.
- Ben Zakour, N.L., Beatson, S.A., van den Broek, A.H.M., Thoday, K.L. & Fitzgerald, J.R. (2012). Comparative genomics of the *Staphylococcus intermedius* group of animal pathogens. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2:44.
- Bervoets, A. & Aerts, O. (2016). Polyhexamethylene biguanide in wound care products: a non-negligible cause of peri-ulcer dermatitis. *Contact Dermatitis*, 74(1), 53-55.
- Bizikova, P., Santoro, D., Marsella, R., Nuttall, T., Eisenschenk, M.N.C. & Pucheu-Haston, C.M. (2015). Review: clinical and histological manifestations of canine atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*, 26(2), 79-e24.
- Bland, J.M. & Altman, D.G. (1999). Measuring agreement in method comparison studies. *Statistical Methods in Medical Research*, 8(2), 135-160.

- Bland, J.M. & Altman, D.G. (2003). Applying the right statistics: analyses of measurement studies. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*, 22(1), 85-93.
- Bland, J.M. & Altman, D.G. (2007). Agreement between methods of measurement with multiple observations per individual. *Journal of Biopharmaceutical Statistics*, 17(4), 571-582.
- Bloom, P. (2014). Canine superficial bacterial folliculitis: current understanding of its etiology, diagnosis and treatment. *The Veterinary Journal*, 199(2), 217-222.
- Bond, R., Collin, N.S. & Lloyd, D.H. (1994). Use of contact plates for the quantitative culture of *Malassezia pachydermatis* from canine skin. *The Journal of Small Animal Practice*, 35(2), 68-72.
- Bond, R., Ferguson, E.A., Curtis, C.F., Craig, J.M. & Lloyd, D.H. (1996). Factors associated with elevated cutaneous *Malassezia pachydermatis* populations in dogs with pruritic skin disease. *The Journal of Small Animal Practice*, 37(3), 103-107.
- Bond, R. & Lloyd, D. H. (1997). Skin and mucosal populations of *Malassezia pachydermatis* in healthy and seborrhoeic Basset Hounds. *Veterinary Dermatology*, 8(2), 101-106.
- Bond, R., Rose, J.F., Ellis, J.W. & Lloyd, D.H. (1995). Comparison of two shampoos for treatment of *Malassezia pachydermatis*-associated seborrhoeic dermatitis in basset hounds. *The Journal of Small Animal Practice*, 36(3), 99-104.
- Boost, M.V., O'Donoghue, M.M. & James, A. (2008). Prevalence of *Staphylococcus aureus* carriage among dogs and their owners. *Epidemiology and Infection*, 136(7), 953-964.
- Borio, S., Colombo, S., La Rosa, G., De Lucia, M., Damborg, P. & Guardabassi, L. (2015). Effectiveness of a combined (4% chlorhexidine digluconate shampoo and solution) protocol in MRS and non-MRS canine superficial pyoderma: a randomized, blinded, antibiotic-controlled study. *Veterinary Dermatology*, 26(5), 339-e72.
- Borkowski, A.W. & Gallo, R.L. (2011). The coordinated response of the physical and antimicrobial peptide barriers of the skin. *Journal of Investigative Dermatology*, 131(2), 285-287.
- Bradbury, S. & Fletcher, J. (2011). Prontosan® made easy. *Wounds International*, 2(2), s25-s30. Acedido em ago. 4, 2016. Disponível em: https://www.bbraun.com/content/dam/catalog/bbraun/bbraunProductCatalog/CW_01_NEW/en-01/b/prontosan-made-easy.pdf.bb-.69982008/prontosan-made-easy.pdf
- Brito, E.H.S., Fontenelle, R.O.S., Brilhante, R.S.N., Cordeiro, R.A., Monteiro, A.J., Sidrim, J.J.C. & Rocha, M.F.G. (2009). The anatomical distribution and antimicrobial susceptibility of yeast species isolated from healthy dogs. *The Veterinary Journal*, 182(2), 320-326.
- Broxton, P., Woodcock, P.M., Heatley, F. & Gilbert, P. (1984). Interaction of some polyhexamethylenebiguanides and membrane phospholipids in *Escherichia coli*. *The Journal of Applied Bacteriology*, 57(1), 115-124.

- Budach, S.C. & Mueller, R.S. (2012). Reproducibility of a semiquantitative method to assess cutaneous cytology. *Veterinary Dermatology*, 23(5), 426-e80.
- Budras, K.-D., McCarthy, P.H., Fricke, W., Richter, R., Horowitz, A. & Berg, R. (2007). *Anatomy of the dog*. (5th ed.). Hannover, Germany: Schlütersche.
- Bumroongthai, K., Chetanachan, P., Niyomtham, W., Yurayart, C. & Prapasarakul, N. (2016). Biofilm production and antifungal susceptibility of co-cultured *Malassezia pachydermatis* and *Candida parapsilosis* isolated from canine seborrheic dermatitis. *Medical Mycology*, 54(5), 544-549.
- Cafarchia, C., Gallo, S., Romito, D., Capelli, G., Chermette, R., Guillot, J. & Otranto, D. (2005). Frequency, body distribution, and population size of *Malassezia* species in healthy dogs and in dogs with localized cutaneous lesions. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 17(4), 316-322.
- Cafarchia, C., Latrofa, M.S., Figueredo, L.A., da Silva Machado, M.L, Ferreiro, L., Guillot, J., Boekhout, T. & Otranto, D. (2011). Physiological and molecular characterization of atypical lipid-dependent *Malassezia* yeasts from a dog with skin lesions: adaptation to a new host? *Medical Mycology*, 49(4), 365-374.
- Cafarchia, C. & Otranto, D. (2008). The pathogenesis of *Malassezia* yeasts. *Parassitologia*, 50(1-2), 65-67. Acedido em fev. 17, 2016. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/23162224>
- Cain, C.L. (2013). Antimicrobial resistance in staphylococci in small animals. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 43(1), 19-40.
- Calogiuri, G.F., Di Leo, E., Trautmann, A., Nettis, E., Ferrannini, A. & Vacca, A. (2013). Chlorhexidine hypersensitivity: a critical and updated review. *Journal of Allergy & Therapy*, 4(4), 141.
- Carlotti, D.-N. (2006). Canine microbial overgrowth [versão eletrônica]. In *Proceedings of the 31st World Small Animal Veterinary Congress of the World Small Animal Veterinary Association, 12th European Congress of the Federation of European Companion Animal Veterinary Associations, 14th National Congress of the Czech Small Animal Veterinary Association: 2006 World Congress WSAVA/FECAVA/CSAVA, Prague, Czech Republic, 11-14 October 2006*, pp. 211-214. Acedido em mar. 23, 2016. Disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/wsava/2006/lecture6/Carlotti2.pdf?LA=1>
- Cavana, P., Peano, A., Petit, J.-Y., Tizzani, P., Perrot, S., Bensignor, E. & Guillot, J. (2015). A pilot study of the efficacy of wipes containing chlorhexidine 0.3%, climbazole 0.5% and Tris-EDTA to reduce *Malassezia pachydermatis* populations on canine skin. *Veterinary Dermatology*, 26(4), 278-e61.
- Chakravorty, S., Helb, D., Burday, M., Connell, N. & Alland, D. (2007). A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 69(2), 330-339.

- Chang, H.J., Miller, H.L., Watkins, N., Arduino, M.J., Ashford, D.A., Midgley, G., Agüero, S.M., Pinto-Powell, R., von Reyn, C.F., Edwards, W., McNeil, M.M. & Jarvis, W.R. (1998). An epidemic of *Malassezia pachydermatis* in an intensive care nursery associated with colonization of health care workers' pet dogs. *The New England Journal of Medicine*, 338(11), 706-711.
- Chen, T.-A. & Hill, P.B. (2005). The biology of *Malassezia* organisms and their ability to induce immune responses and skin disease. *Veterinary Dermatology*, 16(1), 4-26.
- Cheung, H.-Y., Wong, M.M.-K., Cheung, S.-H., Liang, L.Y., Lam, Y.-W. & Chiu, S.-K. (2012). Differential actions of chlorhexidine on the cell wall of *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *PLoS One*, 7(5), e36659. doi: 10.1371/journal.pone.0036659
- Chindera, K., Mahato, M., Sharma, A.K., Horsley, H., Kloc-Muniak, K., Kamaruzzaman, N.F., Kumar, S., McFarlane, A., Stach, J., Bentin, T. & Good, L. (2016). The antimicrobial polymer PHMB enters cells and selectively condenses bacterial chromosomes. *Scientific Reports*, 6, 23121. doi: 10.1038/srep23121.
- Chitty, J. (2006). Respiratory disease in exotics and small mammals. *The Facts – a series of international case studies*, (1). Acedido em ago. 2, 2016. Disponível em: http://www.healthandhygiene.co.za/admin_uploads/files/facts/The%20Facts%20Issue%201_2.pdf
- Clark, S.M., Loeffler, A. & Bond, R. (2015). Susceptibility *in vitro* of canine methicillin-resistant and -susceptible staphylococcal isolates to fusidic acid, chlorhexidine and miconazole: opportunities for topical therapy of canine superficial pyoderma. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 70(7), 2048-2052.
- Cobb, M.A., Edwards, H.J., Jagger, T.D., Marshall, J. & Bowker, K.E. (2005). Topical fusidic acid/betamethasone-containing gel compared to systemic therapy in the treatment of canine acute moist dermatitis. *The Veterinary Journal*, 169(2), 276-280.
- Coenye, T., Van Acker, H., Peeters, E., Sass, A., Buroni, S., Riccardi, G. & Mahenthiralingam, E. (2011). Molecular mechanisms of chlorhexidine tolerance in *Burkholderia cenocepacia* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(5), 1912-1919.
- Colombo, S., Hill, P.B., Shaw, D.J. & Thoday, K.L. (2007). Requirement for additional treatment for dogs with atopic dermatitis undergoing allergen-specific immunotherapy. *The Veterinary Record*, 160(25), 861-864.
- Cordero, A.M. (2015). Pyoderma 2015 [versão eletrônica]. In *Proceedings Book of the 40th World Small Animal Veterinary Association Congress: The Always Amazing Thai Experience, Bangkok, Thailand, 15-18 May 2015*, pp. 207-209. Acedido em mar. 23, 2016. Disponível em: <http://www.wsava2015.net/>
- Coutinho, S.D. & Paula, C.R. (2000). Proteinase, phospholipase, hyaluronidase and chondroitin-sulphatase production by *Malassezia pachydermatis*. *Medical Mycology*, 38(1), 73-76.

- Couto, N., Belas, A., Couto, I., Perreten, V. & Pomba, C. (2014). Genetic relatedness, antimicrobial and biocide susceptibility comparative analysis of methicillin-resistant and -susceptible *Staphylococcus pseudintermedius* from Portugal. *Microbial Drug Resistance*, 20(4), 364-371.
- Couto, N., Monchique, C., Belas, A., Marques, C., Gama, L.T. & Pomba, C. (2016). Trends and molecular mechanisms of antimicrobial resistance in clinical staphylococci isolated from companion animals over a 16 year period. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71(6), 1479-1487.
- Cowley, N.L., Forbes, S., Amézquita, A., McClure, P., Humphreys, G.J. & McBain, A.J. (2015). Effects of formulation on microbiocide potency and mitigation of the development of bacterial insusceptibility. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(20), 7330-7338.
- Creytens, K., Goossens, A., Faber, M., Ebo, D. & Aerts, O. (2014). Contact urticaria syndrome caused by polyaminopropyl biguanide in wipes for intimate hygiene. *Contact Dermatitis*, 71(5), 307-309.
- Curtis, C.F. (1998). Use and abuse of topical dermatological therapy in dogs and cats part 1. Shampoo therapy. *In Practice*, 20(5), 244-251.
- Curtis, C.F., Lamport, A.I. & Lloyd, D.H. (2006). Masked, controlled study to investigate the efficacy of a *Staphylococcus intermedius* autogenous bacterin for the control of canine idiopathic recurrent superficial pyoderma. *Veterinary Dermatology*, 17(3), 163-168.
- Czyżewska, U., Siemieniuk, M., Pyrkowska, A., Nowakiewicz, A., Bieganska, M., Dabrowska, I., Bartoszewicz, M., Dobrzyn, P. & Tylicki, A. (2016). Comparison of lipid profiles of *Malassezia pachydermatis* strains isolated from dogs with otitis externa and without clinical symptoms of disease. *Mycoses*, 59(1), 20-27.
- Daeschlein, G., Assadian, O., Bruck, J.C., Meinel, C., Kramer, A. & Koch, S. (2007). Feasibility and clinical applicability of polihexanide for treatment of second-degree burn wounds. *Skin Pharmacology and Physiology*, 20(6), 292-296.
- David, M., Gabriel, M. & Kopecká, M. (2003). Unusual ultrastructural characteristics of the yeast *Malassezia pachydermatis*. *Scripta Medica (Brno)*, 76(3), 173-186.
- Davis, M.F., Iverson, S.A., Baron, P., Vasse, A., Silbergeld, E.K., Lautenbach, E. & Morris, D.O. (2012). Household transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and other staphylococci. *The Lancet. Infectious Diseases*, 12(9), 703-716.
- Devriese, L.A., Vancanneyt, M., Baele, M., Vaneechoutte, M., De Graef, E., Snauwaert, C., Cleenwerck, I., Dawyndt, P., Swings, J., Decostere, A. & Haesebrouck, F. (2005). *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a coagulase-positive species from animals. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(4), 1569-1573.
- Direção-Geral da Saúde (DGS) (2013). *Programa de prevenção e controlo de infeções e resistências aos antimicrobianos: orientações programáticas*. Acedido em ago. 19, 2016. Disponível em: <http://www.dgs.pt/ficheiros-de-upload-2013/ppcira-orientacoes-programaticas-pdf.aspx>

- Direção-Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV) (2013). *Plano de ação nacional para a redução do uso de antibióticos nos animais*. Acedido em ago. 19, 2016. Disponível em: http://www.dgv.min-agricultura.pt/xeov21/attachfileu.jsp?look_parentBoui=8747539&att_display=n&att_download=y
- Dissemond, J., Augustin, M., Eming, S.A., Goerge, T., Horn, T., Karrer, S., Schumann, H. & Stücker, M. (2014). Modern wound care – practical aspects of non-interventional topical treatment of patients with chronic wounds. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 12(7), 541-554.
- Dissemond, J., Gerber, V., Kramer, A., Riepe, G., Strohal, R., Vassel-Biergans, A. & Eberlein, T. (2010). A practice-oriented recommendation for treatment of critically colonised and locally infected wounds using polyhexanide, *Journal of Tissue Viability*, 19(3), 106-115.
- Eberlein, T. & Assadian, O. (2010). Clinical use of polyhexanide on acute and chronic wounds for antisepsis and decontamination. *Skin Pharmacology and Physiology*, 23(suppl 1), 45-51.
- Eberlein, T., Haemmerle, G., Signer, M., Gruber-Moesenbacher, U., Traber, J., Mittlboeck, M., Abel, M. & Strohal, R. (2012). Comparison of PHMB-containing dressing and silver dressings in patients with critically colonised or locally infected wounds. *Journal of Wound Care*, 21(1), 12, 14-16, 18-20.
- Eberlein, T. & Kanis, J. (2014). *Use of a cellulose PHMB dressing in clinical practice*. London: Wounds UK. Acedido em ago. 12, 2016. Disponível em: http://www.wounds-uk.com/pdf/content_11410.pdf
- Eckholm, N.G., Outerbridge, C.A., White, S.D. & Sykes, J.E. (2013). Prevalence of and risk factors for isolation of methicillin-resistant *Staphylococcus* spp. from dogs with pyoderma in northern California, USA. *Veterinary Dermatology*, 24(1), 154-e34.
- Ekizoğlu, M., Sağiroğlu, M., Kiliç, E. & Haşcelik, A.G. (2016). An investigation of the bactericidal activity of chlorhexidine digluconate against multidrug-resistant hospital isolates. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 46(3), 903-909.
- Elias, P.M. (2007). The skin barrier as an innate immune element. *Seminars in Immunopathology*, 29(1), 3-14.
- Elliot, D. (2007). Some experiences in the use of F10 in the treatment of reptiles. *The Facts – a series of international case studies*, (7). Acedido em ago. 2, 2016. Disponível em: http://www.healthandhygiene.co.za/admin_uploads/files/facts/The%20Facts%20Issue%207_2.pdf
- Elsztein, C., de Lima, R. de C.P., de Barros Pita, W. & de Morais, M.A., Jr. (2016). NCW2, a gene involved in the tolerance to polyhexamethylene biguanide (PHMB), may help in the organisation of β -1,3-glucan structure of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Current Microbiology*, 73(3), 341-345.

- Elsztein, C., de Lucena, R.M. & de Morais, M.A., Jr. (2011). The resistance of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* to the biocide polyhexamethylene biguanide: involvement of cell wall integrity pathway and emerging role for YAP1. *BMC Molecular Biology*, 12, 38.
- Emtestam, L., Kaaman, T. & Rensfeldt, K. (2012). Treatment of distal subungual onychomycosis with a topical preparation of urea, propylene glycol and lactic acid: results of a 24-week, double-blind, placebo-controlled study. *Mycoses*, 55(6), 532-540.
- Fabry, W.H.K. & Kock. (2014). *In-vitro* activity of polyhexanide alone and in combination with antibiotics against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Hospital Infection*, 86(1), 68-72.
- Fabry, W.H.K., Kock, H.-J. & Vahlensieck, W. (2014). Activity of the antiseptic polyhexanide against gram-negative bacteria. *Microbial Drug Resistance*, 20(2), 138-143.
- Favrot, C., Steffan, J., Seewald, W. & Picco, F. (2010). A prospective study on the clinical features of chronic canine atopic dermatitis and its diagnosis. *Veterinary Dermatology*, 21(1), 23-31.
- Fazakerley, J., Nuttall, T., Sales, D., Schmidt, V., Carter, S.D., Hart, C.A. & McEwan, N.A. (2009). Staphylococcal colonization of mucosal and lesional skin sites in atopic and healthy dogs. *Veterinary Dermatology*, 20(3), 179-184.
- Fernandes, P. (2016). Fusidic acid: a bacterial elongation factor inhibitor for the oral treatment of acute and chronic staphylococcal infections. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(1), a025437.
- Ferrarini, A., Baggi, M., Flückiger, R. & Bianchetti, M.G. (2006). Intraoperative anaphylaxis to a chlorhexidine polymer in childhood. *Pediatric Anesthesia*, 16(6), 705.
- Ferreira, D.R.M.S. (2010). *Estudo do pH da pele em cães saudáveis e cães com insuficiência renal crônica*. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10400.5/2770>
- Ferreira dos Santos, E.J. & Moreira da Silva, M.A.N.C.G.M. (2011). Tratamento de feridas colonizadas/infectadas com utilização de polihexanida. *Revista de Enfermagem Referência*, 3(4), 135-142.
- Fewtrell, M.S., Kennedy, K., Singhal, A., Martin, R.M., Ness, A., Hadders-Algra, M., Koletzko, B. & Lucas, A. (2008). How much loss to follow-up is acceptable in long-term randomised trials and prospective studies? *Archives of Disease in Childhood*, 93(6), 458-461.
- Figueredo, L.A., Cafarchia, C., Desantis, S. & Otranto, D. (2012). Biofilm formation of *Malassezia pachydermatis* from dogs. *Veterinary Microbiology*, 160(1-2), 126-131.
- Figueredo, L.A., Cafarchia, C. & Otranto, D. (2013). Antifungal susceptibility of *Malassezia pachydermatis* biofilm. *Medical Mycology*, 51(8), 863-867.

- Finger, S., Wiegand, C., Buschmann, H.-J. & Hipler, U.-C. (2012). Antimicrobial properties of cyclodextrin–antiseptics-complexes determined by microplate laser nephelometry and ATP bioluminescence assay. *International Journal of Pharmaceutics*, 436 (1-2), 851-856.
- Firdessa, R., Good, L., Amstalden, M.C., Chindera, K., Kamaruzzaman, N.F., Schultheis, M., Röger, B., Hecht, N., Oelschlaeger, T.A., Meinel, L., Lühmann, T. & Moll, H. (2015). Pathogen- and host-directed antileishmanial effects mediated by polyhexanide (PHMB). *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(10), e0004041 doi: 10.1371/journal.pntd.0004041
- Fitzgerald, J.R. (2009). The *Staphylococcus intermedius* group of bacterial pathogens: species re-classification, pathogenesis and the emergence of meticillin resistance. *Veterinary Dermatology*, 20(5-6), 490-495.
- Fjeld, H. & Lingaas, E. (2016). Polyhexanide – safety and efficacy as an antiseptic. *Tidsskrift for Den Norske Lægeforening*, 136(8), 707-711.
- Forbes, S., Dobson, C.B., Humphreys, G.J. & McBain, A.J. (2014). Transient and sustained bacterial adaptation following repeated sublethal exposure to microbicides and a novel human antimicrobial peptide. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(10), 5809-5817.
- Forbes, S., Knight, C.G., Cowley, N.L., Amézquita, A., McClure, P., Humphreys, G. & McBain, A.J. (2016). Variable effects of exposure to formulated microbicides on antibiotic susceptibility in Firmicutes and Proteobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(12), 3591-3598.
- Frieling, H., Gründling, M., Lauer, K.-S., Wendt, M., Hachenberg, T., Lehmann, C. & Pavlovic, D. (2006). Intraperitoneal instillation of polyhexanide produces hypotension and vasodilation: *in vivo* and *in vitro* study in rats. *International Journal of Colorectal Disease*, 21(4), 373-380.
- Frieling, H., Lauer, K.-S., Gründling, M., Usichenko, T., Meissner, K., Kanellopoulou, T., Lehmann, C., Wendt, M. & Pavlovic, D. (2007). Peritoneal instillation of taurolidine or polyhexanide modulates intestinal microcirculation in experimental endotoxemia. *International Journal of Colorectal Disease*, 22(7), 807-817.
- Gabinete Regional para a Europa da Organização Mundial da Saúde (2012). *Antibiotic resistance: a growing threat* [News]. Acedido em ago. 17, 2016. Disponível em: <http://www.euro.who.int/en/health-topics/disease-prevention/antimicrobial-resistance/news/news/2012/11/antibiotic-resistance-a-growing-threat>
- Gaitanis, G., Velegraki, A., Mayser, P. & Bassukas, I.D. (2013). Skin diseases associated with *Malassezia* yeasts: facts and controversies. *Clinics in Dermatology*, 31(4), 455-463.
- Garbacz, K., Żarnowska, S., Piechowicz, L. & Haras, K. (2013a). Pathogenicity potential of *Staphylococcus pseudintermedius* strains isolated from canine carriers and from dogs with infection signs. *Virulence*, 4(3), 255-259.
- Garbacz, K., Żarnowska, S., Piechowicz, L. & Haras, K. (2013b). Staphylococci isolated from carriage sites and infected sites of dogs as a reservoir of multidrug resistance and methicillin resistance. *Current Microbiology*, 66(2), 169-173.

- Gardner, B.R. & Le Rochais, C. (2009). F10 used to treat abscesses in two african elephants. *The Facts – a series of international case studies*, (13). Acedido em ago. 2, 2016. Disponível em: http://www.healthandhygiene.co.za/admin_uploads/files/facts/The%20Facts%20Issue%2013_2.pdf
- Gasparetto, ND., Trevisan, Y.P.A., Almeida, N.B., Neves, R.C.S.M., Almeida, A.B.P.F., Dutra, V., Colodel, E.M. & Sousa, V.R.F. (2013). Prevalência das doenças de pele não neoplásicas em cães no município de Cuiabá, Mato Grosso. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 33(3), 359-362.
- Gilliver, S. (2009). PHMB: a well-tolerated antiseptic with no reported toxic effects. *Journal of Wound Care*, Activa Healthcare Supplement November. Acedido em ago. 4, 2016. Disponível em: <http://activahealthcare.co.uk/downloads/clinical-evidence/SXP025-S-Gilliver-PHMB-a-well-tolerated-antiseptic-with-.pdf>
- Glos, N. (2015). Tests for inflammatory dermatoses excluding allergy tests. In *Proceedings Book of the 28th Annual Congress of the European Society and College of Veterinary Dermatology (ESVD-ECVD): Ice Krakow Congress Centre, Krakow, Poland, 24-26 September 2015*, pp. 34-35.
- Godbeer, S.M., Gold, R.M. & Lawhon, S.D. (2013). Prevalence of mupirocin resistance in *Staphylococcus pseudintermedius*. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(4), 1250-1252.
- Goertz, O., Hirsch, T., Ring, A., Muehlberger, T., Steinau, H.U., Tilkorn, D., Lehnhardt, M. & Homann, H.H. (2011). Influence of antiseptics on microcirculation after neuronal and receptor blockade. *International Wound Journal*, 8(4), 365-373.
- Goertz, O., Lauer, H., Hirsch, T., Daigeler, A., Harati, K., Stricker, I., Lehnhardt, M. & von der Lohe, L. (2016). Evaluation of angiogenesis, epithelialisation and microcirculation after application of polyhexanide, chitosan and sodium chloride in rodents. *International Wound Journal*, 13(6), 1161-1167.
- Gordon, M.A. (1979). *Malassezia pityrosporum pachydermatis* (Weidman) Dodge 1935. *Sabouraudia*, 17(3), 305-309.
- Gortel, K. (2013). Recognizing pyoderma: more difficult than it may seem. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 43(1), 1-18.
- Guaguere, E. (1996). Topical treatment of canine and feline pyoderma. *Veterinary Dermatology*, 7(3), 145-151.
- Guardabassi, L. (2016). *In vitro* antimicrobial activity of Zincoseb® shampoo against pathogenic organisms associated with dog skin infections. *icf Bulletin – Scientific Investigation and Veterinary Information*. Acedido em set. 2, 2016. Disponível em: <http://www.mentalism.it/public/upload/PUBBLICAZIONI/ITALIA/icfBulletinZincosebResult-guardabassi.pdf>
- Guardabassi, L., Loeber, M.E. & Jacobson, A. (2004). Transmission of multiple antimicrobial-resistant *Staphylococcus intermedius* between dogs affected by deep pyoderma and their owners. *Veterinary Microbiology*, 98(1), 23-27.

- Haesebrouck, F., Baele, M., De Keyser, H., Hermans, K. & Pasmans, F. (2009). Antimicrobial activity of an acetic and boric acid solution against *Staphylococcus pseudintermedius*. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*, 78, 89-90.
- Halstead, F.D., Rauf, M., Moiemien, N.S., Bamford, A., Wearn, C.M., Fraise, A.P., Lund, P.A., Oppenheim, B.A. & Webber, M.A. (2015). The antibacterial activity of acetic acid against biofilm-producing pathogens of relevance to burns patients. *PLoS One*, 10(9), e0136190. doi: 10.1371/journal.pone.0136190
- Han, S.H., Chung, T.H., Nam, E.H., Park, S.H. & Hwang, C.Y. (2013). Molecular analysis of *Malassezia pachydermatis* isolated from canine skin and ear in Korea. *Medical Mycology*, 51(4), 396-404.
- Harvey, R.G. & Lloyd, D.H. (1994). The distribution of *Staphylococcus intermedius* and coagulase-negative staphylococci on the hair, skin surface, within the hair follicles and on the mucous membranes of dogs. *Veterinary Dermatology*, 5(2), 75-81.
- Harvey, R.G. & Lloyd, D.H. (1995). The distribution of bacteria (other than staphylococci and *Propionibacterium acnes*) on the hair, at the skin surface and within the hair follicles of dogs. *Veterinary Dermatology*, 6(2), 79-84.
- Heit, M.C. & Riviere, J.E. (2009). Antiseptics and disinfectants. In J.E. Riviere & M.G. Papich (Eds.), *Veterinary Pharmacology & Therapeutics*. (9th ed.). (pp. 819-834). Iowa, USA: Wiley-Blackwell.
- Heng, Y.K., Tan, K.T., Sen, P., Chow, A., Leo, Y.S., Lye, D.C. & Chan, R.K.W. (2013). *Staphylococcus aureus* and topical fusidic acid use: results of a clinical audit on antimicrobial resistance. *International Journal of Dermatology*, 52(7), 876-881.
- Hetem, D.J. & Bonten, M.J.M. (2013). Clinical relevance of mupirocin resistance in *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Hospital Infection*, 85(4), 249-256.
- Hill, P.B., Lau, P. & Rybníček, J. (2007). Development of an owner-assessed scale to measure the severity of pruritus in dogs. *Veterinary Dermatology*, 18(5), 301-308.
- Hill, P.B., Lo, A., Eden, C.A.N., Huntley, S., Morey, V., Ramsey, S., Richardson, C., Smith, D.J., Sutton, C., Taylor, M.D., Thorpe, E., Tidmarsh, R. & Williams, V. (2006). Survey of the prevalence, diagnosis and treatment of dermatological conditions in small animals in general practice. *The Veterinary Record*, 158(16), 533-539.
- Hillier, A., Alcorn, J.R., Cole, L.K., Kowalski, J.J. (2006). Pyoderma caused by *Pseudomonas aeruginosa* infection in dogs: 20 cases. *Veterinary Dermatology*, 17(6), 432-439.
- Hillier, A., Lloyd, D.H., Weese, J.S., Blondeau, J.M., Boothe, D., Breitschwerdt, E., Guardabassi, L., Papich, M.G., Rankin, S., Turnidge, J.D. & Sykes, J.E. (2014). Guidelines for the diagnosis and antimicrobial therapy of canine superficial bacterial folliculitis (Antimicrobial Guidelines Working Group of the International Society for Companion Animal Infectious Diseases). *Veterinary Dermatology*, 25(3), 163-e43.
- Hnilica, K.A. (2011). *Small Animal Dermatology: A Color Atlas and Therapeutic Guide*. (3rd ed.). St. Louis, Missouri, USA: Elsevier Saunders.

- Ho, K.K., Campbell, K.L. & Laverne, S.N. (2015). Contact dermatitis: a comparative and translational review of the literature. *Veterinary Dermatology*, 26(5), 314-327.
- Hoet, A.E., van Balen, J., Nava-Hoet, R.C., Bateman, S., Hillier, A., Dyce, J. & Wittum, T.E. (2013). Epidemiological profiling of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-positive dogs arriving at a veterinary teaching hospital. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, 13(6), 385-393.
- Hoffmann, A.R., Patterson, A.P., Diesel, A., Lawhon, S.D., Ly, H.J., Stephenson, C.E., Mansell, J., Steiner, J.M., Dowd, S.E., Olivry, T. & Suchodolski, J.S. (2014). The skin microbiome in healthy and allergic dogs. *PLoS One*, 9(1), e83197. doi: 10.1371/journal.pone.0083197
- Holm, B.R., Rest, J.R. & Seewald, W. (2004). A prospective study of the clinical findings, treatment and histopathology of 44 cases of pyotraumatic dermatitis. *Veterinary Dermatology*, 15(6), 369-376.
- Horner, C., Mawer, D. & Wilcox, M. (2012). Reduced susceptibility to chlorhexidine in staphylococci: is it increasing and does it matter? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(11), 2547-2559.
- Hübner, C. (2009). *Wundbehandlung bei Hund und Katze – unter besonderer Berücksichtigung von Biss- und Abrasionsverletzungen*. Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines Dr. med. vet. Gießen: Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen. Acedido em ago. 3, 2016. Disponível em: <http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2009/6999/pdf/HuebnerCornelia-2009-04-29.pdf>
- Hübner, N.-O. & Kramer, A. (2010). Review on the efficacy, safety and clinical applications of polihexanide, a modern wound antiseptic. *Skin Pharmacology and Physiology*, 23(suppl 1), 17-27.
- Ihrke, P.J. (2006). Integumentary infections. In C.E. Greene (Ed.), *Infectious diseases of the dog and cat*. (3rd ed.). (pp. 807-823). St. Louis, Missouri, USA: Elsevier Saunders.
- Ihrke, P.J. (2009). Canine pyoderma: the most common canine infectious skin disease [versão eletrônica]. In *Proceedings of the Latin American Veterinary Conference (LAVC): Lima, Peru, 16-19 October 2009*, pp. 69-78. Acedido em mar. 23, 2016. Disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/lavc/2009/Ihrke4.pdf>
- Jakobsson, Z. (2011). *Single blinded, randomized, prospective pilot study to evaluate the effect of L-Mesitran honey-based ointment in the treatment of surface pyoderma in dogs*. Student Thesis. Uppsalla: Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Swedish University of Agricultural Sciences. Examensarbete, 2010:72. Acedido em mai. 24, 2016. Disponível em: http://l-mesitran.com/sites/l-mesitran.com/files/zandra_jakobsson_study_feb_2011_final_version.pdf
- Janda, J.M. & Abbott, S.L. (2007). 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(9), 2761-2764.

- Jasmin, P., Schroeder, H., Briggs, M., Last, R. & Sanquer, A. (2003, September). *Assessment of the efficacy of a 3% chlorhexidine shampoo in the control of elevated cutaneous Malassezia populations and associated clinical signs (Malassezia dermatitis) in dogs*. Poster presented at the 19th Annual Congress of the European Society and College of Veterinary Dermatology (ESVD-ECVD), Tenerife, Spain. Acedido em set. 1, 2016. Disponível em: http://www.vetcontact.com/presentations/p_virbac7/p_virbac7.pdf
- Jeffers, J.G. (2013). Topical therapy for drug-resistant pyoderma in small animals. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 43(1), 41-50.
- Jerzsele, Á., Gyetvai, B., Csere, I. & Gálfi, P. (2014). Biofilm formation in *Malassezia pachydermatis* strains isolated from dogs decreases susceptibility to ketoconazole and itraconazole. *Acta Veterinaria Hungarica*, 62(4), 473-480. Acedido em mar. 12, 2016. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/268878809>
- Junqueira, L.C. & Carneiro, J. (2013). *Histologia básica*. (12^a ed.). Rio de Janeiro, Brasil: Guanabara Koogan.
- Kaehn, K. (2010). Polihexanide: a safe and highly effective biocide. *Skin Pharmacology and Physiology*, 23(suppl 1), 7-16.
- Kapalschinski, N., Seipp, H.M., Onderdonk, A.B., Goertz, O., Daigeler, A., Lahmer, A., Lehnhardt, M. & Hirsch, T. (2013). Albumin reduces the antibacterial activity of polyhexanide-biguanide-based antiseptics against *Staphylococcus aureus* and MRSA. *Burns*, 39(6), 1221-1225.
- Karpiński, T.M. & Szkaradkiewicz, A.K. (2015). Chlorhexidine – pharmaco-biological activity and application. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 19(7), 1321-1326.
- Kautz, O., Schumann, H., Degerbeck, F., Venemalm, L. & Jakob, T. (2010). Severe anaphylaxis to the antiseptic polyhexanide. *Allergy*, 65(8), 1058-1072.
- Kawakami, T., Shibata, S., Murayama, N., Nagata, M., Nishifuji, K., Iwasaki, T. & Fukata, T. (2010). Antimicrobial susceptibility and methicillin resistance in *Staphylococcus pseudintermedius* and *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* isolated from dogs with pyoderma in Japan. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 72(12), 1615-1619.
- Khoshnegah, J., Movassaghi, A.R. & Rad, M. (2013). Survey of dermatological conditions in a population of domestic dogs in Mashhad, northeast of Iran (2007-2011). *Veterinary Research Forum*, 4(2), 99-103.
- Kil, D.Y. & Swanson, K.S. (2011). Companion animals symposium: role of microbes in canine and feline health. *Journal of Animal Science*, 89(5), 1498-1505.
- Kligman, A.M., Leyden, J.J. & Stewart, R. (1977). New uses for benzoyl peroxide: a broad-spectrum antimicrobial agent. *International Journal of Dermatology*, 16(5), 413-417.
- Kloos, I., Straubinger, R.K., Werckenthin, C. & Mueller, R.S. (2013). Residual antibacterial activity of dog hairs after therapy with antimicrobial shampoos. *Veterinary Dermatology*, 24(2), 250-e54.

- Kloos, W.E., Zimmerman, R.J. & Smith, R.F. (1976). Preliminary studies on the characterization and distribution of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species on animal skin. *Applied and Environmental Microbiology*, 31(1), 53-59.
- Kobayashi, T., Kano, R., Nagata, M., Hasegawa, A. & Kamata, H. (2011). Genotyping of *Malassezia pachydermatis* isolates from canine healthy skin and atopic dermatitis by internal spacer 1 (IGS1) region analysis. *Veterinary Dermatology*, 22(5), 401-405.
- Körber, A., Seipp, H.-M. & Hofmann, S. (2008). Efficacy of different wound dressings on artificial plaques of fibrin. *In the 18th Conference of the European Wound Management Association (EWMA): Lisbon, Portugal, 14-16 May 2008*. Acedido em ago. 8, 2016. Disponível em: <http://activahealthcare.co.uk/downloads/clinical-evidence/SXP005-Korber-et-al-Efficacy-of-different-wound-dressing.pdf>
- Kowalski, J.J. (1988). The microbial environment of the ear canal in health and disease. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 18(4), 743-754.
- Kramer, A., Roth, B., Müller, G., Rudolph, P., Klöcker, N. (2004). Influence of the antiseptic agents polyhexanide and octenidine on FL cells and on healing of experimental superficial aseptic wounds in piglets. A double-blind, randomised, stratified, controlled, parallel-group study. *Skin Pharmacology and Physiology*, 17(3), 141-146.
- Kristman, V., Manno, M. & Côté, P. (2004). Loss to follow-up in cohort studies: how much is too much? *European Journal of Epidemiology*, 19(8), 751-760.
- Krogh, H.V. & Kristensen, S. (1976). A study of skin diseases in dogs and cats. II. Microflora of the normal skin of dogs and cats [abstract]. *Nordisk Veterinaermedicin*, 28(9), 459-463. Acedido em mar. 11, 2016. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/980697>
- Küsters, M., Beyer, S., Kutscher, S., Schlesinger, H. & Gerhartz, M. (2013). Rapid, simple and stability-indicating determination of polyhexamethylene biguanide in liquid and gel-like dosage forms by liquid chromatography with diode-array detection. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 3(6), 408-414.
- Lachapelle, J.-M. (2014). A comparison of the irritant and allergenic properties of antiseptics. *European Journal of Dermatology*, 24(1), 3-9.
- Langer, S., Sedigh Salakdeh, M., Goertz, O., Steinau, H.U., Steintraesser, L. & Homann, H.H. (2004). The impact of topical antiseptics on skin microcirculation. *European Journal of Medical Research*, 9(9), 449-454.
- Lee, W.R., Tobias, K.M., Bemis, D.A. & Rohrbach, B.W. (2004). *In vitro* efficacy of a polyhexamethylene biguanide-impregnated gauze dressing against bacteria found in veterinary patients. *Veterinary Surgery*, 33(4), 404-411.
- Le Grange, F. (2013). Traumatic facial wound in a Nile monitor. *The Facts – a series of international case studies*, (16). Acedido em ago. 2, 2016. Disponível em: http://www.healthandhygiene.co.za/admin_uploads/files/facts/The%20Facts%20Issue%202016_2.pdf

- Leonard, B.C., Affolter, V.K. & Bevins, C.L. (2012). Antimicrobial peptides: agents of border protection for companion animals. *Veterinary Dermatology*, 23(3), 177-e36.
- Lessing, M.C. & McNulty, A.K. (2012). Intermittent exposure to wound irrigation solutions disrupts *P. aeruginosa* and *S. aureus* immature biofilms in-vitro. *Wound Repair and Regeneration*, 20(2), A28.
- Leysen, J., Goossens, A., Lambert, J. & Aerts, O. (2014). Poyhexamethylene biguanide is a relevant sensitizer in wet wipes. *Contact Dermatitis*, 70(5), 323-325.
- Lloyd, D.H. (2009). Microbial diseases secondary to allergic skin disease – clinical significance and control. *The European Journal of Companion Animal Practice*, 19(3), 254-260.
- Lloyd, D.H. (2011a). Optimising topical antimicrobial therapy [versão eletrónica]. In *Proceedings of the V Southern European Veterinary Conference and 46 Congreso Nacional AVEPA: Barcelona, Spain: Barcelona, Spain, 29 September – 2 October 2011*. Acedido em mar., 23, 2016. Disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/sevc/2011/lectures/eng/21.pdf>
- Lloyd, D.H. (2011b). The challenge of methicillin resistant bacteria – therapy and prevention strategies [versão eletrónica]. In *Proceedings of the V Southern European Veterinary Conference and 46 Congreso Nacional AVEPA: Barcelona, Spain: Barcelona, Spain, 29 September – 2 October 2011*. Acedido em mar. 23, 2016. Disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/sevc/2011/lectures/eng/25.pdf>
- Lloyd, D.H. & Lamport, A.I. (1999). Activity of chlorhexidine shampoos *in vitro* against *Staphylococcus intermedius*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Malassezia pachydermatis*. *The Veterinary Record*, 144(19), 536-537.
- Lloyd, D.H. & Patel, A.P. (2003). Structure and function of the skin. In A.P. Foster & C.S. Foil (Eds.), *BSAVA Manual of Small Animal Dermatology*. (2nd ed.). (pp. 1-10). Quedgeley, Gloucester, England, UK: British Small Animal Veterinary Association.
- Loeffler, A. (2014). Complicating microbial skin infections in allergic dogs. In C. Noli, A. Foster & W. Rosenkrantz (Eds.), *Veterinary Allergy*. (pp. 163-174). Chichester, West Sussex, UK: Wiley-Blackwell.
- Loeffler, A., Baines, S.J., Toleman, M.S., Felmingham, D., Milsom, S.K., Edwards, E.A. & Lloyd, D.H. (2008). *In vitro* activity of fusidic acid and mupirocin against coagulase-positive staphylococci from pets. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62(6), 1301-1304.
- Loeffler, A., Cobb, M.A. & Bond, R. (2011). Comparison of a chlorhexidine and a benzoyl peroxide shampoo as sole treatment in canine superficial pyoderma. *The Veterinary Record*, 169(10), 249.
- Loeffler, A., Pfeiffer, D.U., Lloyd, D.H., Smith, H., Soares-Magalhães, R. & Lindsay, J.A. (2010). Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage in UK veterinary staff and owners of infected pets: new risk groups. *Journal of Hospital Infection*, 74(3), 282-288.

- Loeffler, A., Soares-Magalhães, R., Bond, R. & Lloyd, D.H. (2006). A retrospective analysis of case series using home-prepared and chicken hydrolysate diets in the diagnosis of adverse food reactions in 181 pruritic dogs. *Veterinary Dermatology*, 17(4), 273-279.
- Löflath, A., von Voigts-Rhetz, A., Jaeger, K., Schmid, M., Kuechenhoff, H. & Mueller, R.S. (2007). The efficacy of a commercial shampoo and whirlpooling in the treatment of canine pruritus - a double-blinded, randomized, placebo-controlled study. *Veterinary Dermatology*, 18(6), 427-431.
- López-Rojas, R., Fernández-Cuenca, F., Serrano-Rocha, L. & Pascual, A. (2017). *In vitro* activity of a polyhexanide-betaine solution against high-risk clones of multidrug-resistant nosocomial pathogens. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 35(1), 12-19.
- Ludwig, C., de Jong, A., Moyaert, H., Garch, F.E., Janes, R., Klein, U., Morrissey, I., Thiry, J. & Youala, M. (2016). Antimicrobial susceptibility monitoring of dermatological bacterial pathogens isolated from diseased dogs and cats across Europe (ComPath results). *Journal of Applied Microbiology*, 121(5), 1254-1267.
- Lund, E. (2008). The epidemiology of atopic dermatitis. *Banfield Journal*, 4(2), 17-22. Acedido em out. 9, 2015. Disponível em: http://www.banfield.com/getmedia/34ffd1bf-65e2-4d73-9d81-493231df3d91/4_2-The-epidemiology-of-atopic-dermatitis
- Machado, M.L.S., Ferreiro, L., Ferreira, R.R., Corbellini, L.G., Deville, M., Berthelemy, M. & Guillot J. (2011). *Malassezia* dermatitis in dogs in Brazil: diagnosis, evaluation of clinical signs and molecular identification. *Veterinary Dermatology*, 22(1), 46-52.
- Marsella, R. & Akucewich, L. (2007). Investigation on the clinical efficacy and tolerability of a 0,4% topical stannous fluoride preparation (MedEquine® Gel) for the treatment of bacterial skin infections in horses: a prospective, randomized, double-blinded, placebo-controlled clinical trial. *Veterinary Dermatology*, 18(6), 444-450.
- Maruhashi, E. (2015). *L-Mesitran® in the management of canine otitis externa – a pilot study*. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10400.5/8786>
- Maruhashi, E., São Braz, B., Nunes, T., Pomba, C., Belas, A., Duarte Correia, J.H. & Lourenço, A.M. (2016). Efficacy of medical grade honey in the management of canine otitis externa – a pilot study. *Veterinary Dermatology*, 27(2), 93-8e27.
- Matic, N.M. & Djuric, M. (2016). Efficiency of sanitary wipes impregnated with chlorhexidine digluconate, climbazol, zinc gluconate, tris-EDTA and glicerine in the treatment of *Malassezia* dermatitis in dogs. *iCF Scientific Research and Veterinary Information*. Acedido em set. 1, 2016. Disponível em: http://drbaddaky.com/wp-content/uploads/2016/05/DPE0072-02-Studio-clxWipes_EN.pdf
- Matousek, J.L. & Campbell, K.L. (2002). A comparative review of cutaneous pH. *Veterinary Dermatology*, 13(6), 293–300.

- Matousek, J.L., Campbell, K.L., Kakoma, I. & Schaeffer, D.J. (2003). The effects of four acidifying sprays, vinegar, and water on canine cutaneous pH levels. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 39(1), 29-33.
- Matousek, J.L., Campbell, K.L., Kakoma, I., Solter, P.F. & Schaeffer, D.J. (2003). Evaluation of the effect of pH on *in vitro* growth of *Malassezia pachydermatis*. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 67(1), 56-59.
- Mauldin, E.A., Scott, D.W., Miller, W.H. & Smith, C.A. (1997). *Malassezia* dermatitis in the dog: a retrospective, histopathological and immunopathological study of 86 cases (1990-95). *Veterinary Dermatology*, 8(3), 191-202.
- Mayer, G. (2016). Bacteriology – chapter eight: exchange of genetic information. In R.C. Hunt (Ed.), *Microbiology and Immunology On-line*. Acedido em ago. 18, 2016. Disponível em: <http://www.microbiologybook.org/mayer/genetic%20ex.htm>
- Maynard, L., Rème, C.A. & Viaud, S. (2011). Comparison of two shampoos for the treatment of canine *Malassezia* dermatitis: a randomised controlled trial. *The Journal of Small Animal Practice*, 52(11), 566-572.
- McBain, A.J. & Gilbert, P. (2001). Biocide tolerance and the harbingers of doom. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 47(2), 55-61.
- McDonnell, G. & Russell, A.D. (1999). Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(1), 147-179.
- Meason-Smith, C., Diesel, A., Patterson, A.P., Older, C.E., Mansell, J.M., Suchodolski, J.S. & Hoffmann, A.R. (2015). What is living on your dog's skin? Characterization of the canine cutaneous mycobiota and fungal dysbiosis in canine allergic dermatitis. *FEMS Microbiology Ecology*, 91(12), fiv139. doi: 10.1093/femsec/fiv139
- Miller, W.H., Griffin, C.E. & Campbell, K.L. (2013). *Muller and Kirk's Small Animal Dermatology*. (7th ed.). St. Louis, Missouri, USA: Elsevier Mosby.
- Monchique, C.R.O. (2013). *Evolução da resistência aos antibióticos em Staphylococcus spp. – 1999 a 2006*. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10400.5/6229>
- Moodley, A., Nightingale, E.C., Stegger, M., Nielsen, S.S., Skov, R.L. & Guardabassi, L. (2008). High risk for nasal carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among Danish veterinary practitioners. *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health*, 34(2), 151-157.
- Moore, L.E., Ledder, R.G., Gilbert, P. & McBain, A.J. (2008). *In vitro* study of the effect of cationic biocides on bacterial population dynamics and susceptibility. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(15), 4825-4834.
- Morones-Ramirez, J.R., Winkler, J.A., Spina, C.S. & Collins, J.J. (2013). Silver enhances antibiotic activity against Gram-negative bacteria. *Science Translational Medicine*, 5(190), 190ra81. doi: 10.1126/scitranslmed.3006276

- Morris, D.O. (2013a). How I treat pyoderma with topicals [versão eletrônica]. In *Proceedings of the VII Southern European Veterinary Conference and 48 Congreso Nacional AVEPA: Barcelona, Spain, 17-19 October 2013*. Acedido em mar. 23, 2016. Disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/sevc/2013/en/lectures/17.pdf>
- Morris, D.O. (2013b). *Malassezia* dermatitis and *Malassezia* otic overgrowth [versão eletrônica]. In *Proceedings of the VII Southern European Veterinary Conference and 48 Congreso Nacional AVEPA: Barcelona, Spain, 17-19 October 2013*. Acedido em mar. 23, 2016. Disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/sevc/2013/en/lectures/13.pdf>
- Morris, D.O. (2013c). Multiple drug resistance in staphylococci: how it's changing the way we practice [versão eletrônica]. In *Proceedings of the VII Southern European Veterinary Conference and 48 Congreso Nacional AVEPA: Barcelona, Spain, 17-19 October 2013*. Acedido em mar. 23, 2016. Disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/sevc/2013/en/lectures/14.pdf>
- Morris, D.O., Boston, R.C., O'Shea, K. & Rankin, S.C. (2010). The prevalence of carriage of meticillin-resistant staphylococci by veterinary dermatology practice staff and their respective pets. *Veterinary Dermatology*, 21(4), 400-407.
- Morris, D.O., O'Shea, K., Shofer, F.S. & Rankin, S. (2005). *Malassezia pachydermatis* carriage in dog owners. *Emerging Infectious Diseases*, 11(1), 83-88.
- Morrissey, I., Oggioni, M.R., Knight, D., Curiao, T., Coque, T., Kalkanci, A., Martinez, J.L. & the BIOHYPO Consortium (2014). Evaluation of epidemiological cut-off values indicates that biocide resistant subpopulations are uncommon in natural isolates of clinically-relevant microorganisms. *PLoS One*, 9(1), e86669. doi: 10.1371/journal.pone.0086669
- Mueller, R.S., Bergvall, K., Bensignor, E. & Bond, R. (2012). A review of topical therapy for skin infections with bacteria and yeast. *Veterinary Dermatology*, 23(4), 330-e62.
- Muller, G.H. (1976). Ichthyosis in two dogs [abstract]. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 169(12), 1313-1316. Acedido em mai. 28, 2016. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1002598>
- Müller, G. & Kramer, A. (2000). *In vitro* action of a combination of selected antimicrobial agents and chondroitin sulfate. *Chemico-Biological Interactions*, 124(2), 77-85.
- Müller, G. & Kramer, A. (2008). Biocompatibility index of antiseptic agents by parallel assessment of antimicrobial activity and cellular cytotoxicity. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61(6), 1281-1287.
- Murayama, N., Nagata, M., Terada, Y., Shibata, S. & Fukata, T. (2010a). Comparison of two formulations of chlorhexidine for treating canine superficial pyoderma. *The Veterinary Record*, 167(14), 532-533.
- Murayama, N., Nagata, M., Terada, Y., Shibata, S. & Fukata, T. (2010b). Efficacy of a surgical scrub including 2% chlorhexidine acetate for canine superficial pyoderma. *Veterinary Dermatology*, 21(6), 586-592.

- Murayama, N., Terada, Y., Okuaki, M. & Nagata, M. (2011). Dose assessment of 2% chlorhexidine acetate for canine superficial pyoderma. *Veterinary Dermatology*, 22(5), 449-453.
- Musmade, P.B., Tumkur, A., Trilok, M. & Bairy, K.L. (2013). Fusidic acid – topical antimicrobial in the management of *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5(suppl 4), 381-390.
- Nagase, N., Sasaki, A., Yamashita, K., Shimizu, A., Wakita, Y., Kitai, S. & Kawano, J. (2002). Isolation and species distribution of staphylococci from animal and human skin. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 64(3), 245-250.
- Nagata, M., Murayama, N. & Shibata, K. (2006). Efficacy of Nolvasan® Surgical Scrub containing 2% chlorhexidine acetate in topical management of canine superficial pyoderma: a randomized, double-blinded, controlled study [abstract]. *The Japanese Journal of Veterinary Dermatology*, 12(1), 1-6. Acedido em jul. 26, 2016. Disponível em: https://www.jstage.jst.go.jp/article/jjvd/12/1/12_1_1/_article
- Nagoba, B.S., Selkar, S.P., Wadher, B.J. & Gandhi, R.C. (2013). Acetic acid treatment of pseudomonal wound infections – review. *Journal of Infection and Public Health*, 6(6), 410-415.
- Nardoni, S., Dini, M., Taccini, F. & Mancianti, F. (2007). Occurrence, distribution and population size of *Malassezia pachydermatis* on skin and mucosae of atopic dogs. *Veterinary Microbiology*, 122(1-2), 172-177.
- Nardoni, S., Mancianti, F., Corazza, M. & Rum, A. (2004). Occurrence of *Malassezia* species in healthy and dermatologically diseased dogs. *Mycopathologia*, 157(4), 383-388.
- Negre, A., Bensignor, E. & Guillot, J. (2009). Evidence-based veterinary dermatology: a systematic review of interventions for *Malassezia* dermatitis in dogs. *Veterinary Dermatology*, 20(1), 1-12.
- Neuber, A. & Horvath, C. (2006). Pathophysiology of canine pyoderma. *Companion Animal*, 11(8), 67-72.
- Newbold, G.M., Outerbridge, C.A., Kass, P.H. & Maggs, D.J. (2014). *Malassezia* spp on the periocular skin of dogs and their association with blepharitis, ocular discharge, and the application of ophthalmic medications. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 244(11), 1304-1308.
- Nielsen, T.D., Dean, R.S., Robinson, N.J., Massey, A. & Brennan, M.L. (2014). Survey of the UK veterinary profession: common species and conditions nominated by veterinarians in practice. *The Veterinary Record*, 174(13), 324.
- Nishifuji, K. & Yoon, J.S. (2013). The stratum corneum: the rampart of the mammalian body. *Veterinary Dermatology*, 24(1), 60-e16.
- Nolff, M.C., Layer, A. & Meyer-Lindenberg, A. (2015). Negative pressure wound therapy with instillation for body wall reconstruction using an artificial mesh in a Dachshund. *Australian Veterinary Journal*, 93(10), 367-372.

- Noli, C. (2003). Staphylococcal pyoderma. In A.P. Foster & C.S. Foil (Eds.), *BSAVA Manual of Small Animal Dermatology*. (2nd ed.). (pp. 159-168). Quedgeley, Gloucester, England, UK: British Small Animal Veterinary Association.
- Noli, C (2011). Cytology in dermatology: how to perform and interpret it correctly [versão eletrónica]. In *Proceedings of the 36th World Small Animal Veterinary Congress of the World Small Animal Veterinary Association: Jeju, Korea, 14-17 October 2011*, pp. 309-212. Acedido em abr. 22, 2016. Disponível em: <http://www.vin.com/apputil/content/defaultadv1.aspx?pId=11343&meta=Generic&catId=34561&id=5124263>
- Noli, C. (2015). The different facetes of pyoderma and their management. In *Proceedings Book of the 28th Annual Congress of the European Society and College of Veterinary Dermatology (ESVD-ECVD): Ice Krakow Congress Centre, Krakow, Poland, 24-26 September 2015*, pp. 72-73.
- Norma n.º 018/2014 de 09/12/2014 atualizada a 27/04/2015. *Prevenção e controlo de colonização e infeção por Staphylococcus aureus resistente à metilicina (MRSA) nos Hospitais e Unidades de Internamento de Cuidados Continuados Integrados*. Direção-Geral da Saúde. Lisboa. Acedido em mai. 30, 2016. Disponível em: <https://www.dgs.pt/directrizes-da-dgs/normas-e-circulares-normativas/norma-n-0182014-de-09122014.aspx>
- Nuttall, T. (2003). *Malassezia dermatitis*. In A.P. Foster & C.S. Foil (Eds.), *BSAVA Manual of Small Animal Dermatology*. (2nd ed.). (pp. 175-180). Quedgeley, Gloucester, England, UK: British Small Animal Veterinary Association.
- Nuttall, T., Harvey, R.G. & McKeever, P.J. (2009). *A Colour Handbook of Skin Diseases of the Dog and Cat*. (2nd ed.). London, England, UK: Manson Publishing Ltd.
- Olivieri, J., Eigenmann, P.A. & Hauser, C. (1998). Severe anaphylaxis to a new disinfectant: polyhexanide, a chlorhexidine polymer [abstract]. *Schweizerische Medizinische Wochenschrift*, 128(40), 1508-1511. Acedido em ago. 1, 2016. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9888165>
- Olivry, T., Saridomichelakis, M., Nuttall, T., Bensignor, E., Griffin, C.E. & Hill, P.B. (2014). Validation of the Canine Atopic Dermatitis Extent and Severity Index (CADESI)-4, a simplified severity scale for assessing skin lesions of atopic dermatitis in dogs. *Veterinary Dermatology*, 25(2), 77–e25.
- O'Neill, D.G., Church, D.B., McGreevy, P.D., Thomson, P.C. & Brodbelt, D.C. (2014). Prevalence of disorders recorded in dogs attending primary-care veterinary practices in England. *PLoS One*, 9(3), e90501. doi: 10.1371/journal.pone.0090501
- Organização Mundial da Saúde (OMS) (2014a). *Antimicrobial resistance: global report on surveillance*. Genebra, Suíça: Organização Mundial da Saúde. Acedido em ago. 16, 2016. Disponível em: <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/>

- Organização Mundial da Saúde (OMS) (2014b). *WHO's first global report on antibiotic resistance reveals serious, worldwide threat to public health* [news release]. Acedido em ago. 16, 2016. Disponível em:
<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/amr-report/en/>
- Organização Mundial da Saúde (OMS) (2015a). *Antibiotic resistance* [fact sheet]. Acedido em ago. 15, 2016. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/antibiotic-resistance/en/>
- Organização Mundial da Saúde (OMS) (2015b). *Antimicrobial resistance* [fact sheet]. Acedido em jun. 28, 2016. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/>
- Organização Mundial da Saúde (OMS) (2015c). *Global action plan on antimicrobial resistance*. Genebra, Suíça: Organização Mundial da Saúde. Acedido em ago. 16, 2016. Disponível em:
http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/193736/1/9789241509763_eng.pdf?ua=1
- Organização Mundial da Saúde (OMS) (2015d). *10 facts on antimicrobial resistance* [fact files]. Acedido em jun. 28, 2016. Disponível em:
http://www.who.int/features/factfiles/antimicrobial_resistance/en/
- Organização Mundial da Saúde (OMS) (2016). *United Nations high-level meeting on antimicrobial resistance*. Acedido em ago. 17, 2016. Disponível em:
<http://www.who.int/drugresistance/events/UNGA-meeting-amr-sept2016/en/>
- Organização Mundial da Saúde (OMS), Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO) & Organização Mundial para a Saúde Animal (OIE) (2016). *Antimicrobial resistance: a manual for developing national action plans*. Acedido em ago. 19, 2016. Disponível em:
<http://www.who.int/drugresistance/action-plans/manual/en/>
- Organização Mundial para a Saúde Animal (OIE) (2015). *Antimicrobial resistance* [fact sheet]. Acedido em ago. 15, 2016. Disponível em:
http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Media_Center/docs/pdf/Fact_sheets/ANTIBIO_EN.pdf
- Ortalda, C., Noli, C. & Cena, T. (2016). Efficacy of an ethanol/guar/triclosan/glycerine gel on bacteria and yeast loads in canine pododermatitis: a pilot study. *The Journal of Small Animal Practice*, 57(4), 205-209.
- Osuna, D.J., DeYoung, D.J. & Walker, R.L. (1990). Comparison of three skin preparation techniques part 2: clinical trial in 100 dogs. *Veterinary Surgery*, 19(1), 20-23.
- Pariser, M., Gard, S., Gram, D. & Schmeitzel, L. (2013). An *in vitro* study to determine the minimal bactericidal concentration of sodium hypochlorite (bleach) required to inhibit meticillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* strains isolated from canine skin. *Veterinary Dermatology*, 24(6), 632-e157.
- Paul, N.C., Moodley, A., Ghibaud, G. & Guardabassi, L. (2011). Carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in small animal veterinarians: indirect evidence of zoonotic transmission. *Zoonoses and Public Health*, 58(8), 533-539.

- Pereira, A.L. & Pita, J.R. (2005). Alexander Fleming (1881-1955): da descoberta da penicilina (1928) ao Prémio Nobel (1945). *Revista da Faculdade de Letras, Série III*, 6, 129-151.
- Piatkowski, A., Drummer, N., Andriessen, A., Ulrich, D. & Pallua, N. (2011). Randomized controlled single center study comparing a polyhexanide containing bio-cellulose dressing with silver sulfadiazine cream in partial-thickness dermal burns. *Burns*, 37(5), 800-804.
- Picco, F., Zini, E., Nett, C., Naegeli, C., Bigler, B., Rüfenacht, S., Roosje, P., Gutzwiller, M.E.R., Wilhelm, S., Pfister, J., Meng, E. & Favrot, C. (2008). A prospective study on canine atopic dermatitis and food-induced allergic dermatitis in Switzerland. *Veterinary Dermatology*, 19(3), 150-155.
- Pin, D., Carlotti, D.-N., Jasmin, P., DeBoer, D.J. & Prélaud, P. (2006). Prospective study of bacterial overgrowth syndrome in eight dogs. *The Veterinary Record*, 158(13), 437-441.
- Pinchbeck, L.R., Cole, L.K., Hillier, A., Kowalski, J.J., Rajala-Schultz, P.J., Bannerman, T.L. & York, S. (2006). Genotypic relatedness of staphylococcal strains isolated from pustules and carriage sites in dogs with superficial bacterial folliculitis. *American Journal of Veterinary Research*, 67(8), 1337-1346.
- Politano, A.D., Campbell, K.T., Rosenberger, L.H. & Sawyer, R.G. (2013). Use of silver in the prevention and treatment of infections: silver review. *Surgical Infections*, 14(1), 8-20.
- Poovelikunnel, T., Gethin, G. & Humphreys, H. (2015). Mupirocin resistance: clinical implications and potential alternatives for the eradication of MRSA. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 70(10), 2681-2692.
- Prohic, A. & Kasumagic-Halilovic, E. (2009). Identification of *Malassezia pachydermatis* from healthy and diseased human skin [abstract]. *Medical Archives*, 63(6), 317-319.
- Raabe, P., Mayser, P. & Weiss, R. (1998). Demonstration of *Malassezia furfur* and *M. sympodialis* together with *M. pachydermatis* in veterinary specimens. *Mycoses*, 41(11-12), 493-500.
- Rankin, S.C. (2015). What's new and relevant with regard to multiresistant *Staphylococcus*. In *Proceedings Book of the 28th Annual Congress of the European Society and College of Veterinary Dermatology (ESVD-ECVD): Ice Krakow Congress Centre, Krakow, Poland, 24-26 September 2015*, pp. 52-53.
- Rankin, S.C., Cain, C.C. & Morris, D.O. (2015). Antibacterial therapy in veterinary dermatology. In *Proceedings Book of the 28th Annual Congress of the European Society and College of Veterinary Dermatology (ESVD-ECVD): Ice Krakow Congress Centre, Krakow, Poland, 24-26 September 2015*, pp. 58-60.
- Ravens, P.A., Vogelnest, L.J., Ewen, E., Bosward, K.L. & Norris, J.M. (2014). Canine superficial bacterial pyoderma: evaluation of skin surface sampling methods and antimicrobial susceptibility of causal *Staphylococcus* isolates. *Australian Veterinary Journal*, 92(5), 149-155.

- Rembe, J.D., Fromm-Dornieden, C., Schäfer, N., Böhm, J.K. & Stuermer, E.K. (2016). Comparing two polymeric biguanides: chemical distinction, antiseptic efficacy and cytotoxicity of polyaminopropyl biguanide (PAPB) and polyhexamethylene biguanide (PHMB). *Journal of Medical Microbiology*, 65(8), 867-876.
- Renzoni, A., Landelle, C., Von Dach, E., Bonetti, E.J., Manzano, C., Schrenzel, J., Harbarth, S. & François, P. (2015, April). *Polyhexanide MIC profiles after topical decolonization of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) carriage*. Poster presented at the 25th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Copenhagen, Denmark. Acedido em set. 8, 2016. Disponível em: https://www.escmid.org/escmid_publications/escmid_elibrary/material/?mid=29278
- Ribeiro do Prado, M., Brilhante, R.S.N., Cordeiro, R.A., Monteiro, A.J., Sidrim, J.J.C. & Rocha, M.F.G. (2008). Frequency of yeasts and dermatophytes from healthy and diseased dogs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 20(2), 197-202.
- Ribeiro do Prado, M., Brilhante, R.S.N., Sidrim, J.J.C. & Rocha, M.F.G. (2007). *Malassezia* spp. em humanos e pequenos animais: uma abordagem teórica. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 102(563-564), 207-214.
- Rich, J.T., Neeley, J.G., Paniello, R.C., Voelker, C.C.J., Nussenbaum, B. & Wang, E.W. (2010). A practical guide to understanding Kaplan-Meier curves. *Otolaryngology – Head and Neck Surgery*, 143(3), 331-336.
- Robinson, N.J. (2014). *Use of sentinel practices to obtain data regarding common clinical conditions and presentations in small animal consultations*. Ph.D. Thesis. The University of Nottingham. Acedido em out. 3, 2015. Disponível em: <http://eprints.nottingham.ac.uk/14285/>
- Robinson, N.J., Dean, R.S., Cobb, M. & Brennan, M.L. (2015). Investigating common clinical presentations in first opinion small animal consultations using direct observation. *The Veterinary Record*, 176(18), 463.
- Rosychuk, R.A.W. (2011). Canine lick granuloma. In *Proceedings of the 36th World Small Animal Veterinary Congress WSAVA: Jeju, Korea, 14-17 October, 2011*, pp. 632-634. Acedido em set. 13, 2016. Disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/wsava/2011/157.pdf>
- Russell, A.D. (2000). Do biocides select for antibiotic resistance? *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 52(2), 227-233.
- Rybníček, J., Lau-Gillard, P.J., Harvey, R. & Hill, P.B. (2009). Further validation of a pruritus severity scale for use in dogs. *Veterinary Dermatology*, 20(2), 115-122.
- Ryssel, H., Gazyakan, E., Germann, G., Hellmich, S., Riedel, K., Reichenberger, M.A. & Radu, C.A. (2010). Antiseptic therapy with a polylactic acid–acetic acid matrix in burns. *Wound Repair and Regeneration*, 18(5), 439-444.
- Saijonmaa-Koulumies, L.E. & Lloyd, D.H. (1996). Colonization of the canine skin with bacteria. *Veterinary Dermatology*, 7(3), 153-162.

- Sakpal, T.V. (2010). Sample size estimation in clinical trial. *Perspectives in Clinical Research*, 1(2), 67-69.
- Samour, J. & Naldo, J. (2008). The use of F10 in falcon medicine: practical applications. *The Facts – a series of international case studies*, (8). Acedido em ago. 2, 2016. Disponível em: http://www.healthandhygiene.co.za/admin_uploads/files/facts/The%20Facts%20Issue%208_2.pdf
- Sardi, J. de C.O., Pitangui, N. de D.S., Rodríguez-Arellanes, G., Taylor, M.L., Fusco-Almeida, A.M. & Mendes-Giannini, M.J.S. (2014). Highlights in pathogenic fungal biofilms. *Revista Iberoamericana de Micología*, 31(1), 22-29.
- Saridomichelakisa, M.N., Koutinasa, A.F., Gioulekasb, D. & Leontidis, L. (1999). Canine atopic dermatitis in Greece: clinical observations and the prevalence of positive intradermal test reactions in 91 spontaneous cases. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 69(1), 61-73.
- Sasaki, T., Kikuchi, K., Tanaka, Y., Takahashi, N., Kamata, S. & Hiramatsu, K. (2007). Reclassification of phenotypically identified *Staphylococcus intermedius* strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(9), 2770-2778.
- Scheelings, T.F., Dobson, E.C., Hooper, C. & Eden, P. (2015). Cutaneous and systemic mycoses from infection with *Lecanicillium* spp. in captive Guthega skinks (*Liopholis guthega*). *Australian Veterinary Journal*, 93(7), 248-251.
- Schilling, J. & Mueller, R.S. (2012). Double-blinded, placebo-controlled study to evaluate an antipruritic shampoo for dogs with allergic pruritus. *The Veterinary Record*, 171(4), 97.
- Schmidt, V.M. (2015). All about pyoderma [versão eletrónica]. In *Proceedings of the 48th European Veterinary Conference Voorjaarsdagen: Companion Animal Scientific Proceedings, Amsterdam, the Netherlands, 9-11 April 2015*. Acedido em mar. 22, 2016. Disponível em: <http://www.voorjaarsdagen.eu/conference-info/european-veterinary-conference-voorjaarsdagen/proceedings/category/95-companion-animal-scientific-proceedings-2015>
- Schmidt, V.M., Williams, N.J., Pinchbeck, G., Corless, C.E., Shaw, S., McEwan, N., Dawson, S. & Nuttall, T. (2014). Antimicrobial resistance and characterisation of staphylococci isolated from healthy Labrador retrievers in the United Kingdom. *BMC Veterinary Research*, 10, 17.
- Schnuch, A., Geier, J., Uter, W., Basketter, D.A. & Jowsey, I.R. (2007). The biocide polyhexamethylene biguanide remains an uncommon contact allergen. *Contact Dermatitis*, 56(4), 235-239.
- Schrøder, M.A., Kirketerp-Møller, K. & Winther, L. (2014). Mistanke om anafylaksi hos sårpatient i behandling med et polyhexanidholdigt sårprodukt [Suspected anaphylaxis by wound treatment with polyhexanide derivate wound products]. *Ugeskrift for Læger*, 176(25A), V02120094.
- Scott, D.W. & Paradis, M. (1990). A survey of canine and feline skin disorders seen in a university practice: Small Animal Clinic, University of Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec (1987-1988). *The Canadian Veterinary Journal*, 31(12), 830-835.

- Seltzer, J.D., Flynn-Lurie, A.K., Marsella, R. & Brennan, M.M. (2010). Investigation of the clinical efficacy of 0.2% topical stannous fluoride for the treatment of canine superficial pyoderma: a prospective, randomized, double-blinded, placebo-controlled trial. *Veterinary Dermatology*, 21(3), 249-258.
- Shah, M. & Mohanraj, M. (2003). High levels of fusidic acid-resistant *Staphylococcus aureus* in dermatology patients. *British Journal of Dermatology*, 148(5), 1018-1020.
- Siegel, F., Skocypec, N., Minnich, K., Cook, L., Polito, P., Wilkins, R. & Unverdorben, M. (2012, November). *Polyhexanide and betaine containing wound care gel reduces the growth of microorganisms by LOG 4,3 to LOG 8,5 over the 8-week follow-up in-vitro (59/60 measurements)*. Poster presented at Desert Foot 9th Annual High Risk Diabetic Foot Conference, Phoenix, AZ, USA. Acedido em ago. 4, 2016. Disponível em: https://www.eiseverywhere.com/file_uploads/d802965769afb291375e067bc2ae8999_Minnich_Poster_8wkInVitro_DesertFoot_14Nov2012_v1.0F.pdf
- Sihelská, Z., Váczi, P. & Conková, E. (2016). Species composition of *Malassezia* yeasts in dogs in Slovakia [abstract]. *Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift*, 129(7-8), 351-354. Acedido em ago. 21, 2016. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27529998>
- Silva, J.M.M. (2012). *Cicatrização e influência da polihexanida tópica no processo de reparação de feridas cutâneas induzidas em papagaio-verdadeiro (Amazona aestiva) (Linnaeus, 1758)*. Dissertação de Mestrado em Ciências Veterinárias. Uberlândia, Minas Gerais: Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia. Acedido em jul. 3, 2016. Disponível em: <http://biblioteca.versila.com/10215800>
- Silvestri, D.L. & McEnery-Stonelake, M. (2013). Chlorhexidine: uses and adverse reactions. *Dermatitis*, 24(3), 112-118.
- Slabber, M. (2008). Some experiences and successes with F10 products in equine practice. *The Facts – a series of international case studies*, (10). Acedido em ago. 2, 2016. Disponível em: http://www.healthandhygiene.co.za/admin_uploads/files/facts/The%20Facts%20Issue%2010_2.pdf
- Slauson, D.O. & Cooper, B.J. (2002). Pathology – the study of disease. In D.O. Slauson & B.J. Cooper (Eds.), *Mechanisms of disease: a textbook of comparative general pathology*. (3rd ed.). (pp. 1-15). St. Louis, Missouri, USA: Elsevier Mosby.
- Somayaji, R., Priyantha, M.A., Rubin, J.E. & Church, D. (2016). Human infections due to *Staphylococcus pseudintermedius*, an emerging zoonosis of canine origin: report of 24 cases. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 85(4), 471-476.
- Song, S.J., Lauber, C., Costello, E.K., Lozupone, C.A., Humphrey, G., Berg-Lyons, D., Caporaso, J.G., Knights, D., Clemente, J.C., Nakielnny, S., Gordon, J.I., Fierer, N. & Knight, R. (2013). Cohabiting family members share microbiota with one another and with their dogs. *eLife* [electronic resource], 2:e00458. doi: 10.7554/eLife.00458


- Souza, A.L., Ceridório, L.F., Paula, G.F., Mattoso, L.H.C. & Oliveira, O.N., Jr. (2015). Understanding the biocide action of poly(hexamethylene biguanide) using Langmuir monolayers of dipalmitoyl phosphatidylglycerol. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, 132, 117-121.
- Souza, T.M., Figuera, R.A., Kommers, G.D. & Barros, C.S.L. (2009). Aspectos histológicos da pele de cães e gatos como ferramenta para dermatopatologia. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 29(2), 177-190.
- Standford, M. (2006). Control of circovirus infection in psittacine birds using F10SC disinfectant and avian gamma interferon. *The Facts – a series of international case studies*, (2). Acedido em ago. 2, 2016. Disponível em: http://www.healthandhygiene.co.za/admin_uploads/files/facts/The%20Facts%20Issue%202_2.pdf
- Starlander, G., Börjesson, S., Grönlund-Andersson, U., Tellgren-Roth, C. e Melhus, Å. (2014). Cluster of infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in humans in a tertiary hospital. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(8), 3118-3120.
- Stepanović, S., Dimitrijević, V., Vuković, D., Dakić, I., Savić, B. & Švabic-Vlahović, M. (2001). *Staphylococcus sciuri* as a part of skin, nasal and oral flora in healthy dogs. *Veterinary Microbiology*, 82, 177-185.
- Sterling, J.P. (2014). Silver-resistance, allergy, and blue skin: truth or urban legend? *Burns*, 40(suppl 1), S19-S23.
- Stolarick, R., Minnich, K., Olinger, S., Brill, F., Chilson, G. & Unverdorben, M. (2010). Polihexanide and betaine containing wound care solution and gel reduce the growth of microorganisms by more than LOG 5 in-vitro. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 50(9), 1071.
- Sturgeon, A., Costa, M. & Weese, J.S. (2012). Preliminary evaluation of the bacterial microbiome of the skin and ear in dogs. In S.M.F., Torres & A. Foster (Eds.), *Abstracts of the 7th World Congress of Veterinary Dermatology, July 24–28, 2012, Vancouver, Canada* [special issue]. *Veterinary Dermatology*, 23(suppl 1), 2-104.
- Swinney, A., Fazakerley, J., McEwan, N. & Nuttall, T. (2008). Comparative *in vitro* antimicrobial efficacy of commercial ear cleaners. *Veterinary Dermatology*, 29(6), 373-379.
- Tanaka, T., Ishii, M., Nakano, S., Mori, Y., Yano, Y., Iijima, T., Takeda, K. & Kido, Y. (2006). Microbial degradation of disinfectants: two new aromatic degradation products of chlorhexidine, chlorhexidine aromatic degradation product (CHADP)-4 and CHADP-6, produced by *Pseudomonas* sp. strain no. A-3. *Journal of Health Science*, 52(1), 58-62.
- Tarpataki, N., Pápa, K., Reiczigel, J., Vajdovich, P. & Vörös, K. (2006). Prevalence and features of canine atopic dermatitis in Hungary. *Acta Veterinaria Hungarica*, 54(3), 353-366.

- Teramoto, H., Kumeda, Y., Yokoigawa, K., Hosomi, K., Kozaki, S., Mukamoto, M. & Kohda, T. (2015). Genotyping and characterisation of the secretor lipolytic enzymes of *Malassezia pachydermatis* isolates collected from dogs. *The Veterinary Record Open*, 2(2), e000124. doi: 10.1136/vetreco-2015-000124
- Thomas, L., Maillard, J.-Y., Lambert, R.J.W. & Russell, A.D. (2000). Development of resistance to chlorhexidine diacetate in *Pseudomonas aeruginosa* and the effect of a “residual” concentration. *Journal of Hospital Infection*, 46(4), 297-303.
- Tizard, I.R. (2013). *Veterinary immunology*. (9th ed). St. Louis, Missouri, USA: Elsevier Saunders.
- Todar, K. (2012). Bacterial resistance to antibiotics. In K. Todar (Ed.), *Todar's Online Textbook of Bacteriology*. Madison, Wisconsin, USA: Kenneth Todar, PhD. Acedido em ago. 18, 2016. Disponível em: http://textbookofbacteriology.net/resantimicrobial_3.html
- Udenberg, T.J., Griffin, C.E., Rosenkrantz, W.S., Ghubash, R.M., Angus, J.C., Polissar, N.L. & Neradilek, M.B. (2014). Reproducibility of a quantitative cutaneous cytological technique. *Veterinary Dermatology*, 25(5), 435-e67.
- Uri, M., Buckley, L.M., Marriage, L., McEwan, N. & Schmidt, V.M. (2016). A pilot study comparing *in vitro* efficacy of topical preparations against veterinary pathogens. *Veterinary Dermatology*, 27(3), 152-e39.
- Valentine, B.K., Dew, W., Yu, A., Weese, J.S. (2012). *In vitro* evaluation of topical biocide and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus pseudintermedius* from dogs. *Veterinary Dermatology*, 23(6), 493-e95.
- Velegraki, A., Cafarchia, C., Gaitanis, G., Latta, R. & Boekhout, T. (2015). *Malassezia* infections in humans and animals: pathophysiology, detection and treatment. *PLoS Pathogens*, 11(1), e1004523. doi: 10.1371/journal.ppat.1004523
- Viaud, S., Maynard, L. & Sanquer, A. (2012). Comparison of two shampoos as sole treatment for canine bacterial overgrowth syndrome. *The Veterinary Record*, 170(26), 675.
- Vieira, D.B. (2008). *Infecção cutânea no doente atópico canino*. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10400.5/985>
- Wael, M.K. & Husein, M.G. (2011). Diagnosis of recurrent pyoderma in dogs by traditional and molecular based diagnostic assays and its therapeutic approach. *Journal of American Science*, 7(3), 120-134.
- Wang, Q.-M., Theelen, B., Groenewald, M., Bail, F.-Y. & Boekhout, T. (2014). *Moniliellomycetes* and *Malasseziomycetes*, two new classes in *Ustilaginomycotina*. *Persoonia*, 33, 41-47.
- Weese, J.S. (2013). The canine and feline skin microbiome in health and disease. *Veterinary Dermatology*, 24(1), 137-e31.

- Weese, J.S. & van Duijkeren, E. (2010). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine. *Veterinary Microbiology*, 140(3-4), 418-429.
- Weitz, N.A., Lauren, C.T., Weiser, J.A., LeBoeuf, N.R., Grossman, M.E., Biagas, K., Garzon, M.C. & Morel, K.D. (2013). Chlorhexidine gluconate-impregnated central access catheter dressings as a cause of erosive contact dermatitis. *JAMA Dermatology*, 149(2), 195-199.
- Werner, A.H. & Russell, A.D. (1999). Mupirocin, fusidic acid and bacitracin: activity, action and clinical uses of three topical antibiotics. *Veterinary Dermatology*, 10(3), 225-240.
- Wiegand, C., Abel, M., Ruth, P. & Hippler, U.-C. (2012). Analysis of the adaptation capacity of *Staphylococcus aureus* to commonly used antiseptics by microplate laser nephelometry. *Skin Pharmacology and Physiology*, 25(6), 288-297.
- Wild, T., Bruckner, M., Payrich, M., Schwarz, C., Eberlein, T. & Andriessen, A. (2012). Eradication of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pressure ulcers comparing a polyhexanide-containing cellulose dressing with polyhexanide swabs in a prospective randomized study. *Advances in Skin & Wound Care*, 25(1), 17-22.
- Wilhem, S., Kovalik, M. & Favrot, C. (2011). Breed associated phenotypes in canine atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*, 22(2), 143-149.
- Willey, J.M., Sherwood, L.M. & Woolverton, C.J. (2008). *Prescott, Harley, and Klein's microbiology*. (7th ed.). New York, USA: McGraw-Hill.
- Wounds International (2014). International Best Practice Guidelines: *Effective skin and wound management of non-complex burns*. Acedido em ago. 12, 2016. Disponível em: <http://www.midlandsburnnetwork.nhs.uk/Library/WoundInternationalBestPracticeGuidelinesNonComplex.pdf>
- Young, R., Buckley, L., McEwan, N. & Nuttall, T. (2012). Comparative *in vitro* efficacy of antimicrobial shampoos: a pilot study. *Veterinary Dermatology*, 23(1), 36-e8.
- Zur, G., Ihrke, P.J., White, S.D. & Kass, P.H. (2002). Canine atopic dermatitis: a retrospective study of 266 cases examined at the University of California, Davis, 1992-1998. Part I. Clinical features and allergy testing results. *Veterinary Dermatology*, 13(2), 89-102.

ANEXO 1 – Apresentação criada para divulgação do projeto no Hospital Escolar da FMV-ULisboa (pp. 1, 20 e 26).


Faculdade de Medicina Veterinária
Universidade de Lisboa
Hospital Escolar



Ana Mafalda Lourenço
Berta São Braz
Joana Cardoso

Ensaio clínico

PROJETO DE TESE DE MESTRADO




Veterinary Dermatology

Veri Dermatol 2014; 25: 163–162 DOI: 10.1111/vid.12118

Guidelines for the diagnosis and antimicrobial therapy of canine superficial bacterial folliculitis (Antimicrobial Guidelines Working Group of the International Society for Companion Animal Infectious Diseases)

Andrew Miller*, David H. Lloyd†, J. Scott Weese‡, Joseph M. Blondeau§, Dawn Booth¶, Edward Breitschwerdt**, Luca Guardabassi††, Mark G. Papich***, Shelley Rankin‡‡, John D. Turnidge§§ and Jane E. Sykes†††



"Topical therapy of SBF is probably underused..."

"... there are significant potential advantages for early and frequent use of the topical approach in this disease."

"The emergence of highly multiresistant MRS with few or no options for systemic AMD therapy has provided a new stimulus for the topical approach, which is emerging as an important treatment for multidrug-resistant bacterial infections of the skin."


"In general, topical therapy is helpful in all patients with SBF."

"Topical therapy alone is encouraged as a desirable and recommended approach to the treatment of SBF..."

"One of the major problems is a lack of in vivo studies that assess the clinical efficacy and safety of topical therapy..."

"A recente systematic review found ample evidence for the efficacy of chlorhexidine for treatment of SBF..."

SEGUIMENTO CLÍNICO

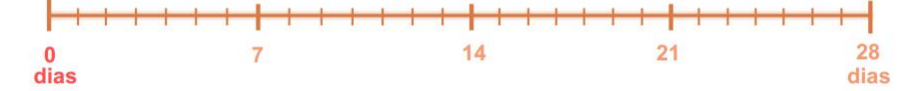


- Score clínico das lesões
- Registo fotográfico
- Registo do grau de prurido
- Citologia cutânea

Final do tratamento:


- Questionário ao proprietário

Follow up pós tratamento



0 dias
7
14
21
28 dias


- Recolha de amostra para identificação da bactéria




ANEXO 2 – Termo de consentimento informado.



Termo de Consentimento Informado

A polihexanida no controlo de infeções bacterianas e por <i>Malassezia</i>: estudo clínico preliminar no Cão	
Instituição onde decorre o projeto: Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa	
Investigador responsável:	Sob a orientação de: Dra. Ana Mafalda Lourenço
Joana Cardoso – Mestranda Estagiária em Dermatologia	Responsável pelo Serviço de Dermatologia do Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa
Nome do paciente 	
Idade:	Género: <input type="checkbox"/> Macho <input type="checkbox"/> Macho castrado <input type="checkbox"/> Fêmea <input type="checkbox"/> Fêmea esterilizada
Raça:	
Nome do proprietário	
Cartão de cidadão/Bilhete de Identidade:	
Morada:	
Telefone/telemóvel:	
E-mail:	

Eu, _____, proprietário/responsável por _____, após devidamente informado sobre os procedimentos a realizar, declaro que concedo o meu total consentimento à sua participação neste projeto de investigação e à utilização dos dados recolhidos¹, incluindo registos fotográficos do meu animal, para fins de publicação.


Data: _____ de _____ de _____

Assinatura do proprietário: _____

¹ A utilização da informação recolhida exclui os meus dados pessoais.

ANEXO 3 – Ficha de registo do *score* clínico.

Avaliação do tipo e distribuição de lesões do(a):

Dia ____ do tratamento 
Data: ____/____/____
☐ Joana ☐ Prof. Mafalda

Score clínico das lesões (coluna da esquerda):

Ausente (0)

Poucas lesões dispersas ou ocasionais / grau ligeiro (1)

Muitas lesões dispersas ou lesões frequentes / grau moderado (2)

Muitas lesões confluentes / grave (3)

A ser avaliado para *score* clínico (atribuir pontuação de 0 a 3 a cada lesão e somar total das lesões):

Lesões primárias

Pápulas ☐

Pústulas ☐

Lesões secundárias

Colaretes epidérmicos ☐

Crostras ☐

Seborreia ☐

Eritema ☐

Alopécia ☐

Erosões/úlceras ☐

Outras lesões presentes (assinalar presença, apenas):

Lesões primárias

Máculas ☐

Vesículas ☐

Nódulos ☐

Quistos ☐

Lesões secundárias

Liquenificação ☐

Comedões ☐

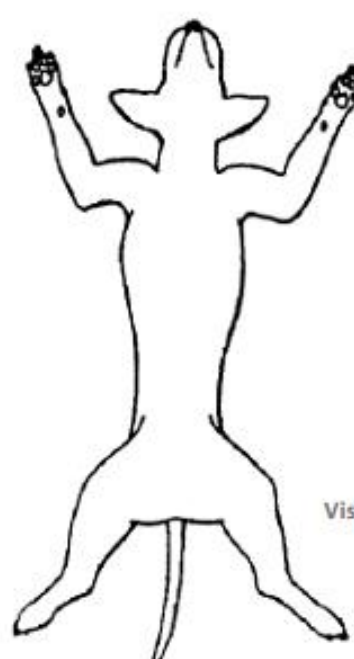
Fístula ☐

Hiperpigmentação ☐

Score clínico global: ____
(score máximo=24)



Vista dorsal



Vista ventral

ANEXO 4 – Ficha para avaliação do grau de prurido.



A POLIHEXANIDA NO CONTROLO DE INFEÇÕES BACTERIANAS E POR *MALASSEZIA*: ESTUDO CLÍNICO PRELIMINAR NO CÃO



Determinação do grau de prurido/comichão do(a):

Dia _____ do tratamento

Data: ____/____/____



Por favor, leia as descrições de baixo para cima.

Sinais de comichão podem incluir:

- ✓ Coçar
- ✓ Mordiscar
- ✓ Lamber
- ✓ Mastigar
- ✓ Esfregar



Prurido extremamente grave e intenso/episódios de comichão quase contínuos. O meu cão não pára de se coçar/mordiscar/lamber/esfregar independentemente do que esteja a acontecer, mesmo durante a consulta no veterinário – para que isto não aconteça é necessário ser fisicamente contido.

Prurido grave e intenso/episódios de comichão prolongados. Estes episódios podem ocorrer à noite (se observados) e também quando come, brinca, faz exercício ou está distraído.

Prurido moderado/episódios regulares. Estes episódios podem ocorrer à noite (se observados), mas não quando come, brinca, faz exercício ou está distraído.

Prurido ligeiro/um pouco mais frequente. Não acontece enquanto dorme, come, brinca, faz exercício ou está distraído.

Prurido muito ligeiro/apenas episódios ocasionais. O meu cão tem ligeiramente mais comichão do que antes do problema de pele começar.

Cão normal. Não acho que comichão seja um problema.

Agora que já leu todas as descrições faça uma **marca na escala vertical** para indicar aquele que acha que é o ponto correspondente ao grau de prurido do seu cão.

A polihexanida no controlo de infeções bacterianas e por Malassezia: estudo clínico preliminar no Cão

Tese de Mestrado em Medicina Veterinária - Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa

Daquilo que se lembra, qual acha que foi o grau de melhoria das lesões de pele da no final do tratamento, em comparação ao dia 0? Poderá utilizar as fotografias anexas como orientação.

Avaliação quantitativa

- ☐ 100% de melhoria
- ☐ mais que 50% de melhoria
- ☐ 50% de melhoria
- ☐ menos que 50% de melhoria
- ☐ 0% de melhoria

Avaliação qualitativa

- ☐ resolução total das lesões, o meu cão recuperou totalmente
- ☐ houve melhoria franca, resolução quase total das lesões
- ☐ houve uma melhoria significativa em número e/ou aspeto das lesões
- ☐ melhorou ligeiramente, mas sem grande diferença para o 1º dia
- ☐ não houve qualquer melhoria
- ☐ piorou

A polihexanida no controlo de infeções bacterianas e por *Malassezia*: estudo clínico preliminar no Cão

Tese de Mestrado em Medicina Veterinária - Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa

***Obrigatório**

Embora apenas as perguntas com asterisco sejam obrigatórias, gostaríamos de apelar a que respondessem também às perguntas não obrigatórias sempre que tal se aplique.

1 - Quão fácil achou a aplicação do produto de tratamento? *

- ☐ Muito fácil
- ☐ Fácil
- ☐ Um pouco difícil
- ☐ Muito difícil

Pode explicar o motivo?

Apenas se respondeu "um pouco difícil" ou "muito difícil".

2 - Achou o produto de tratamento desagradável, de alguma forma? *

Por exemplo: cheiro, aspeto, etc.

- ☐ Não
- ☐ Sim

Pode explicar o motivo?

Apenas se respondeu "sim".

3 - Acha que o produto de tratamento teve um efeito positivo na condição do seu cão? *

- ☐ Sim
- ☐ Não
- ☐ Foi indiferente

(continua)

4 - Em termos globais, ficou satisfeito(a) com a entrada do seu cão no projeto? *

- ☐ Sim
- ☐ Não

Pode explicar o motivo?

Apenas se respondeu "não".

5 - Consideraria voltar a participar num projeto de investigação na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, se tal lhe fosse proposto? *

Tendo em conta a sua participação neste projeto.

- ☐ Sim, sem dúvida
- ☐ Talvez
- ☐ Não, de todo

6 - Se quiser, deixe um comentário.

ANEXO 7 – Caracterização geral dos doentes.

N.º	Grupo	Sexo	Estado reprodutivo	Raça	Idade (anos)	Peso (kg)
1	Clor	M	Inteiro	Cão de Pastor Alemão	8	46,0
2	Clor	F	Esterilizada	Yorkshire Terrier	9	7,5
3	P	F	Inteira	Boxer	10	27,8
4	P	F	Esterilizada	Retriever do Labrador	4	41
5	Clor	M	Inteiro	Bulldogue Francês	3	16,1
6	Clor	F	Esterilizada	Weimaraner	1	29,4
7	P	F	Inteira	Bulldogue Francês	5	13,2
8	P	F	Inteira	Retriever do Labrador	4	32,1
9	Clor	F	Inteira	Bulldogue Francês	1	4,4
10	Clor	F	Inteira	Caniche	6	2,7
11*	P	F	Esterilizada	SRD	3	21
12	P	F	Inteira	Bulldogue Francês	1	12,7
13	Clor	M	Inteiro	Bulldogue Francês	2	11,2
14	Clor	F	Esterilizada	SRD	8	37,5
15	P	M	Castrado	Cão de Pastor Alemão	11	36,3
16	P	F	Inteira	Shih Tzu	5	7,7
17	Clor	F	Esterilizada	Dogue Alemão	1	49
18	Clor	M	Castrado	Retriever do Labrador	9	35,7

* Doente incluído duas vezes; números 11a (1.ª participação) e 11b (2.ª participação) dos Anexos 9 e 10.
Clor – clorexidina; F – fêmea; M – macho; P – polihexanida; SRD – sem raça definida.

ANEXO 8 – Caracterização dos doentes quanto a doenças concomitantes.

N.º	Grupo	Otite	DAC	Doença endócrina	Outras
1	Clor	N	S	N	Osteoartrose grave bilateral (Mp)
2	Clor	N	S	N	-
3	P	S (BC)	S	N	Carcinoma mamário, mastocitoma; displasia da anca
4	P	N	S	Hipotiroidismo	-
5	Clor	N	S	N	-
6	Clor	N	S	N	-
7	P	N	S	N	-
8	P	N	S	N	-
9	Clor	N	N	Addison congénita	-
10	Clor	N	S	N	-
11*	P	N	S	N	-
12	P	N	S	N	-
13	Clor	N	S	N	Displasia da anca
14	Clor	N	N	Hipotiroidismo, Cushing	-
15	P	N	S	N	-
16	P	S (CL)	S	N	-
17	Clor	N	S	N	-
18	Clor	N	S	N	Displasia do cotovelo (artrose bilateral associada)

* Doente incluído duas vezes; números 11a (1.ª participação) e 11b (2.ª participação) dos Anexos 9 e 10.

(BC) – Bastonetes e cocos; (CL) – cocos e leveduras; (Mp) – membros pélvicos; Clor – clorexidina; DAC – Dermatite atópica canina; F – fêmea; M – macho; N – não; P – polihexanida; S – sim.

ANEXO 9 – Caracterização da infecção cutânea de cada doente no dia 0 do tratamento.

N.º	Grupo	Agente	Episódio	Diagnóstico	Regiões corporais afetadas	Lesões (distribuição variável)
1	Clor	B	R	Foliculite	Dc+Mp(lat)	Seb, alo
2	Clor	M (+B)	R	DM, foliculite, PM	PL+ABD+ING	Pap, pust, cros, erit, hiperp
3	P	B	R	Foliculite	ABD+ING+ID(dv)	Seb, alo, erit, hiperp
4	P	B	R	Foliculite	PL+ABD+ING+ID(v)	Pap, pust, col, cros, erit, comedões
5	Clor	B	R	Foliculite	PL+ABD+ING+PN+Dc+ID(d)	Cros, erit, alo
6	Clor	B	R	Foliculite	PL+Dc+ID(d)	Pap, cros, erit, alo, ero
7	P	B	1.º	Foliculite	ID(d)	Erit
8	P	F	R	DM	PL+ING+PN+ID(d)	Erit, alo, liq
9	Clor	B	1.º	Impetigo	ABD+ING	Pust, col, cros, erit
10	Clor	F	1.º	DM	ABD+ING+Dc	Pap, erit
11a	P	M (+L)	1.º	DM, foliculite	ID(d)	Cros, erit
11b	P	B	1.º	Foliculite	ABD+ING+ID(v)	Pust, erit
12	P	M (+L)	1.º	DM, foliculite	PregasF+PL+AXI+ID(dv)	Cros, erit, escoriações
13	Clor	B	R	Foliculite	AXI+ABD+ING+PN+Mt(flex)+Mp(med)+ID(dv)	Pap, pust, erit
14	Clor	B	R	Foliculite	Mt(d)+transição PN-Mp	Cros, seb, erit, hiperp
15	P	B	R	<i>Hot spot</i>	Cauda(v)	Erit, alo, ero
16	P	M (+B)	R	DM, foliculite	TRX(v)+Mp(lat)+ID(v)	Col, cros, erit, alo
17	Clor	M (+L)	R	DM, foliculite	PL	Erit, alo, hiperp, liq
18	Clor	M (+B)	R	DM, foliculite	PL+ID(dv)	Erit, alo

(+B) – predominância de bactérias; (+L) – predominância de leveduras; (d) – dorsal; (dv) – dorsal e ventral; (flex) – região flexora; (lat) – lateral; (med) – medial; (v) – ventral; ABD – abdominal; alo – alopecia; AXI – axilar; B – bacteriana; Clor – clorexidina; col – colares; cros – crostas; Dc – dorso caudal; DM – Dermatite por *Malassezia*; erit – eritema; ero – erosões; F – fúngica; hiper – hiperpigmentação; ID – interdigital; ING – inguinal; liq – liquenificação; M – mista; Mp/Mt – membro(s) pélvico(s)/torácico(s); P – polihexanida; pap – pápulas; PL – perilabial; PM – piodermite mucocutânea; PN – perineal; PregasF – pregas faciais; pust – pústulas; R – recorrente; seb – seborreia; TRX – tórax.

ANEXO 10 – Comparação dos resultados da citologia (dia 0) e da cultura bacteriana.

N.º	Grupo	Citologia				Isolado bacteriano
		Amostra 1	Local.bac	Amostra 2	Local.bac	
1	Clor	B	ex	-	-	-
2	Clor	B/C/L	inex/inex	B/C	inex/inex	<i>E. coli</i>
3	P	B/C	ex/inex	C	ex	<i>S. pseudintermedius</i>
4	P	B/C	inex/inex	C	inex	<i>S. pseudintermedius</i>
5	Clor	B/C	inex/inex	B/C	ex/ex	<i>Staphylococcus</i> sp.
6	Clor	B/C	ex/inex	-	-	<i>S. pseudintermedius</i>
7	P	B/C	inex/inex	-	-	Neg. cultura aeróbia
8	P	B/L	ex	B/L	ex	<i>S. pseudintermedius</i> *
9	Clor	B/C/L	ex/inex	-	-	<i>S. pseudintermedius</i>
10	Clor	L	-	B/L	ex	NA
11a	P	B/C/L	ex/inex	-	-	-
11b	P	C	in	-	-	-
12	P	C/L	in	B/L	ex	<i>Staphylococcus</i> sp.
13	Clor	C	in	-	-	<i>S. pseudintermedius</i>
14	Clor	B/C	ex/inex	-	-	<i>Staphylococcus</i> sp.
15	P	B/C	in/inex	-	-	<i>Staphylococcus</i> sp.
16	P	C/L	inex	L	-	<i>Staphylococcus</i> sp.
17	Clor	C/L	inex	-	-	-
18	Clor	B/C	inex/inex	B/C/L	ex/ex	<i>S. pseudintermedius</i>

* Cultura pura.

B – bastonetes; C – cocos; Clor – clorexidina; ex – extracelulares; in – intracelulares; inex – intra e extracelulares; L – leveduras; Local.bac – localização das bactérias; NA – não aplicável; Neg. – negativa; P – polihexanida.

ANEXO 11 – Perfil de suscetibilidade a antibióticos das estirpes recolhidas.

N.º	AMP	AMK	AMC	CTX	FUS	FOF	PEN	CLI	ERY	OXA	ENR	CIP	GEN	SXT	TET	CHL	MIN	AB prévia ≤6 meses
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	LEX
2	R	S	R	R	-	R	-	-	-	-	S	-	S	S	S	-	-	AMC, GEN(au)
3	S	S	S	-	S	S	S	S	S	S	S	-	S	S	S	S	S	AMC
4	S	S	S	-	S	S	R	I	I	S	S	-	S	S	R	S	R	AMC, CIP
5	S	S	S	-	S	S	S	S	S	S	S	-	S	S	S	-	-	-
6	R	R	R	-	S	S	R	R	R	S	-	R	R	R	R	R	I	AMC, LEX, MIN
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	R	S	R	-	S	S	R	R	R	S	S	-	S	R	S	S	S	-
9	S	S	S	-	S	S	R	R	R	S	S	-	I	S	R	S	S	AMC
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	AMC
12	R	S	S	-	S	S	R	R	R	S	S	-	S	R	R	R	R	AMC
13	R	S	R	-	S	-	R	S	S	S	-	R	S	S	R	S	R	AMC
14	S	S	S	-	S	S	S	S	S	S	S	-	S	S	S	S	S	AMC
15	S	S	S	-	S	S	R	S	S	S	S	-	S	S	R	S	S	MBX(au)
16	R	S	S	-	S	S	R	S	S	S	S	-	S	S	S	S	S	MBX(au), MUP(to), VEC
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	LEX
18	S	S	S	-	S	S	S	S	I	S	S	-	S	S	I	S	S	AMC

(au) – auricular; (to) – tópico; AB – antibioterapia; AMC – amoxicilina/ácido clavulânico; AMK – amicacina; AMP – ampicilina; CHL – cloranfenicol; CIP – ciprofloxacina; CLI – clindamicina; Clor – clorexidina; CTX – cefotaxima; ENR – enrofloxacina; ERY – eritromicina; FOF – fosfomicina; FUS – ácido fusídico; GEN – gentamicina; I – intermédio; LEX – cefalexina; MBX – marbofloxacina; MIN – minociclina; MUP – mupirocina; OXA – oxacilina; P – polihexanida; PEN – penicilina; R – resistente; S – suscetível; SXT – trimetoprim/sulfametoxazol; TET – tetraciclina; VEC – cefovecin.

ANEXO 12 – Registo dos *scores* clínicos atribuídos pela estagiária para os quais existia um correspondente *score* clínico atribuído pela orientadora, refletindo o mesmo doente avaliado no mesmo dia.

N.º	Grupo	Score_J	Score_M	Dif_Scores	Média_Scores
1	Clor	5	6	-1	5,5
2	Clor	6	6	0	6
2	Clor	3	2	1	2,5
3	P	5	6	-1	5,5
4	P	9	10	-1	9,5
4	P	8	9	-1	8,5
4	P	6	5	1	5,5
4	P	7	6	1	6,5
5	Clor	5	7	-2	6
5	Clor	4	3	1	3,5
5	Clor	2	2	0	2
6	Clor	6	7	-1	6,5
6	Clor	4	3	1	3,5
8	P	2	2	0	2
9	Clor	6	5	1	5,5
9	Clor	5	4	1	4,5
11a	P	3	2	1	2,5
12	P	4	4	0	4
12	P	4	4	0	4
13	Clor	9	8	1	8,5
14	Clor	9	9	0	9
14	Clor	6	4	2	5
14	Clor	9	9	0	9
15	P	8	7	1	7,5
15	P	3	3	0	3
16	P	8	8	0	8
16	P	7	6	1	6,5
16	P	4	3	1	3,5
16	P	5	4	1	4,5
16	P	8	8	0	8
17	Clor	5	5	0	5
17	Clor	3	1	2	2
17	Clor	3	2	1	2,5
18	Clor	3	5	-2	4
18	Clor	2	3	-1	2,5

Clor – clorexidina; Dif_Scores – diferença entre *scores* do mesmo par; Média_Scores – média dos *scores* do mesmo par (cada par de *scores* está representado numa linha da tabela); P – polihexanida; Score_J – *scores* clínicos atribuídos pela estagiária; Score_M – *scores* clínicos atribuídos pela orientadora.

ANEXO 13 – Progressão do *score* clínico (N=19).

N.º	Grupo	Score clínico						
		T0*	T1*	T2*	T3*	T4*	T5*	T6*
		(0d)	(7±3d)	(14±3d)	(21±3d)	(28±3d)	(35±3d)	(42±3d)
1	Clor	5	-	3 ⁽¹⁾	-	-	-	3 ⁽²⁾
2	Clor	6	5	1 ⁽³⁾	0 ⁽⁴⁾	-	3 ⁽⁵⁾	-
3	P	5 ⁽⁶⁾	6 ⁽⁷⁾	-	-	-	-	-
4	P	9	8 ^(5,8)	-	6	7 ⁽⁹⁾	-	4
5	Clor	5 ⁽⁵⁾	4	4	5 ^(5,10,11)	2 ⁽⁵⁾	-	-
6	Clor	6 ⁽⁵⁾	-	4 ⁽¹²⁾	4 ⁽³⁾	4 ⁽⁵⁾	4 ⁽¹¹⁻¹³⁾	2 ^(14,15)
7	P	3	-	-	-	-	-	-
8	P	2 ⁽¹²⁾	2 ^(16,17)	-	-	-	-	-
9	Clor	9	6	5	6 ⁽¹⁸⁾	2	-	-
10	Clor	3 ⁽⁵⁾	6	9 ⁽¹⁹⁾	-	-	1	-
11a	P	3 ^{(5)**}	1 ^(3,8)	1 ⁽²⁰⁾	-	0 ⁽⁴⁾	1 ⁽²²⁾	1 ⁽²³⁾
11b	P	2	-	4 ⁽²¹⁾	0 ^(4,22)	0 ⁽²³⁾	0 ⁽²⁴⁾	0 ⁽²⁵⁾
12	P	4 ⁽⁵⁾	4 ⁽³⁾	1	2 ^{(4,17)***}	2 ^(5,24,26)	2 ⁽⁴⁾	-
13	Clor	9 ^(5,27)	-	8 ⁽²⁸⁾	7 ^(27,29)	-	-	5 ^(4,5,13,17)
14	Clor	9 ⁽³⁰⁾	10 ⁽³¹⁾	6	9 ⁽⁴⁾	-	-	-
15	P	8 ⁽³²⁾	3	2 ⁽⁴⁾	0	-	-	-
16	P	8 ^(5,29,32)	-	7 ⁽³³⁾	4 ⁽³⁴⁾	5	-	8 ^(4,35,36)
17	Clor	5 ⁽⁵⁾	3 ⁽³⁷⁾	3	-	-	-	-
18	Clor	3 ^(12,38)	2	1	-	-	-	-

Os campos cor de laranja traduzem os *dropouts*; o 1.º campo cor de laranja na linha de um doente marca o momento a partir do qual esse doente foi considerado *dropout*. Os campos a verde marcam o período em que ocorreu o evento de interesse “cura clínica” na análise de Kaplan-Meier.

Clor – clorexidina; P – polihexanida.

* T0 corresponde ao dia de inclusão no projeto; T1, T2, T3, T4, T5 e T6 correspondem, sensivelmente e respetivamente, à 1.ª, 2.ª, 3.ª, 4.ª, 5.ª e 6.ª semanas após inclusão.

** Suspende corticosteroide *per os* um dia depois, devido a polaquiúria.

*** *Score* clínico ≠ 0, porque surgiu infeção na região interdigital, que não estava presente na consulta de inclusão; as infeções iniciais na região axilar e pregas faciais estavam resolvidas e a doente não apresentava quaisquer lesões nessas zonas, portanto para a análise de sobrevivência considerou-se que o evento de interesse tinha ocorrido.

⁽¹⁾ Descobertas lesões de piodermite profunda em ambas as coxas do doente, na região coxofemoral; recolha de amostra para cultura e TSA/CIM; faz mais uma semana de biocida nas lesões do dorso caudal, enquanto se aguarda o resultado da cultura; previsão de saída do projeto em T3, com início de antibioterapia adequada.

⁽²⁾ Este *score* refere-se às lesões iniciais; inicia antibiótico *per os* (minociclina) para piodermite profunda.

⁽³⁾ Inicia ciclosporina.

⁽⁴⁾ Suspende biocida.

⁽⁵⁾ Inicia período de 3 a 5 dias de corticosteroide *per os* (prednisolona).

⁽⁶⁾ Concomitante otite bacteriana; inicia preparação auricular com miconazol, gentamicina e hidrocortisona; inicia corticosteroide *per os* (prednisolona), a administrar de 5 em 5 dias; mitoxantrona administrada um dia depois da entrada no projeto.

⁽⁷⁾ Doente retirada do projeto; inicia antibiótico *per os* (cefalexina).

⁽⁸⁾ Concomitante otite por *Malassezia*; inicia preparação auricular com miconazol, polimixina B e prednisolona.

⁽⁹⁾ Inicia antibiótico *per os* (amoxicilina/ácido clavulânico).

⁽¹⁰⁾ Sem infeção (Anexo 14). *Score* clínico atribuído a prurido/inflamação não relacionada com infeção.

⁽¹¹⁾ Suspende biocida e inicia corticosteroide de uso tópico (aceponato de metilprednisolona).

- (12) Inicia corticosteroide *per os* (prednisolona), até reavaliação.
- (13) Desenvolve dermatite por *Malassezia*; inicia banhos semanais e lavagens diárias (ou dia sim, dia não) na região interdigital com champô de clorexidina e miconazol.
- (14) Suspende corticosteroide *per os* (prednisolona).
- (15) Suspende lavagens diárias nas patas e mantém banhos semanais com champô de clorexidina e miconazol.
- (16) Doente retirada do projeto; inicia antifúngico *per os* (itraconazol) e tópico (clotrimazol).
- (17) Inicia corticosteroide de uso tópico (aceponato de hidrocortisona).
- (18) Suspende biocida; inicia pomada de palmitato de retinol intercalada com creme reparador à base de sucralfato, sulfato de cobre, sulfato de zinco e óxido de zinco; reduz dose de corticosteroide *per os* (prednisolona).
- (19) Doente retirada do projeto; inicia antifúngico *per os* (itraconazol).
- (20) Inicia biocida em lesões pustulares nas regiões abdominal e inguinal (T0 de 11b).
- (21) Suspende biocida nas patas (T4 de 11a).
- (22) Suposto início de corticosteroide de uso tópico (aceponato de hidrocortisona) nas patas, mas apenas efetuado durante um dia (T3 de 11b; T5 de 11a).
- (23) Inicia corticosteroide de uso tópico (aceponato de hidrocortisona) em todas as patas (T4 de 11b; T6 de 11a).
- (24) Retoma biocida na região interdigital devido a infecção por bactérias do tipo cocos.
- (25) Suspende biocida na região interdigital (infecção resolvida); suspende aceponato de hidrocortisona e inicia outro corticosteroide de uso tópico (aceponato de metilprednisolona) na região interdigital.
- (26) Suspende aceponato de hidrocortisona na região interdigital.
- (27) Administração de imunoterapia.
- (28) Interrompe ciclosporina 5 dias antes devido a diarreia intensa e inicia corticosteroide *per os* (prednisolona); mantém agora prednisolona, dia sim, dia não; retoma ciclosporina numa dose mais baixa e aumenta gradualmente ao longo das semanas seguintes.
- (29) Concomitante otite mista; inicia preparação auricular com clotrimazol, marbofloxacina e dexametasona.
- (30) Inicia trilostano na sequência de diagnóstico de hiperadrenocorticismismo adrenal-dependente; corticosteroide *per os* (prednisolona) apenas em SOS.
- (31) Correção do protocolo de aplicação do tratamento: entre T0 e T1 fez o biocida BID, em vez de SID.
- (32) Correção da dose e/ou protocolo de ciclosporina.
- (33) Suspende preparação auricular; dois dias depois inicia nova preparação auricular com clorexidina e tris-EDTA.
- (34) Iniciou corticosteroide de uso tópico (aceponato de metilprednisolona) três dias antes, na sequência de agravamento do prurido (grau 9/10) após interrupção de toda a medicação (ciclosporina e biocida) cinco dias antes; suspende agora metilprednisolona tópica; retoma ciclosporina e biocida.
- (35) Inicia antibiótico *per os* (cefovecina).
- (36) Ectoparasitas (pulgas) observados durante a consulta; prescrição de fluralaner pela via oral.
- (37) Aumento da dose de corticosteroide *per os* (prednisolona).
- (38) Inicia corticosteroide de uso tópico (aceponato de metilprednisolona) e tacrolimus nos pavilhões auriculares.

ANEXO 14 – Progressão do *score* citológico (N=19).

N.º	Grupo	Score citológico							Região
		T0* (0d)	T1* (7±3d)	T2* (14±3d)	T3* (21±3d)	T4* (28±3d)	T5* (35±3d)	T6* (42±3d)	
1	Clor	3	-	0 ⁽¹⁾	-	-	-	NR ⁽²⁾	Dc
2	Clor	9	2**	0 ⁽³⁾	NR ⁽⁴⁾	-	NR	-	PL ⁽⁶⁾
		3	3**	0 ⁽³⁾	NR ⁽⁴⁾	-	0 ⁽⁵⁾	-	ABD ⁽⁷⁾
3	P	4 ⁽⁸⁾	0 ⁽⁹⁾	-	-	-	-	-	ING ⁽⁶⁾
		1 ⁽⁸⁾	0 ⁽⁹⁾	-	-	-	-	-	ID ⁽⁷⁾
4	P	6	0 ^(5,10)	-	NR	NR ⁽¹¹⁾	-	NR	PL ⁽⁶⁾
		1	0 ^(5,10)	-	4	NR ⁽¹¹⁾	-	NR	ABD/ING ⁽⁷⁾
5	Clor	6 ⁽⁵⁾	NR	0	0 ⁽¹²⁾	NR	-	-	PL ⁽⁶⁾
		2 ⁽⁵⁾	NR	1**	NR ^(5,12)	NR	-	-	ID ⁽⁷⁾
6	Clor	6 ⁽⁵⁾	-	2 ⁽¹³⁾	2 ^{(3)**}	1 ⁽⁵⁾	4 ⁽¹²⁻¹⁴⁾	0 ^(15,16)	ID
7	P	4	-	-	-	-	-	-	ID
8	P	4 ⁽¹³⁾	NR ^(17,18)	-	-	-	-	-	PL
		3 ⁽¹³⁾	8 ^(17,18)	-	-	-	-	-	ID
		4 ⁽¹³⁾	NR ^(17,18)	-	-	-	-	-	PN
9	Clor	5	0	2	2 ⁽¹⁹⁾	NR	-	-	ABD/ING
10	Clor	4 ⁽⁵⁾	5	NR ⁽²⁰⁾	-	-	NR	-	Dc ⁽⁶⁾
		5	6	4	-	-	0	-	ABD ⁽⁷⁾
11a	P	7 ^{(5)**}	1 ^{(3,10)**}	1 ⁽²¹⁾	-	0 ⁽⁴⁾	0 ⁽²³⁾	3 ⁽²⁴⁾	ID
11b	P	2	-	NR ⁽²²⁾	0 ^(4,23)	0 ⁽²⁴⁾	0 ⁽²⁵⁾	NR ⁽²⁶⁾	ABD/ING
12	P	3 ⁽⁵⁾	1 ⁽³⁾	0	0 ^(4,18)	NR ⁽⁵⁾	NR	-	AXI ⁽⁷⁾
		4 ⁽⁵⁾	2 ⁽³⁾	0	NR ⁽⁴⁾	NR ⁽⁵⁾	NR	-	PregasF ⁽⁶⁾
		-	-	3	0 ^(4,18)	3 ^(5,25,27)	0 ⁽⁴⁾	-	ID
13	Clor	2 ^(5,28)	-	0 ⁽²⁹⁾	1 ^(28,30)	-	-	2 ^(4,5,14,18)	ID ⁽⁶⁾
		-	-	-	2 ^(28,30)	-	-	1 ^(4,5)	ABD/ING
14	Clor	2 ⁽³¹⁾	0 ⁽³²⁾	0	NR ⁽⁴⁾	-	-	-	PN/M
15	P	4 ⁽³³⁾	1**	- ⁽⁴⁾	0	-	-	-	Cauda
16	P	2 ^(5,30,33)	-	4 ⁽³⁴⁾	3 ⁽³⁵⁾	NR	-	3 ^(4,36,37)	TRX ⁽⁶⁾
		1	-	NR	NR	NR	-	NR	M
17	Clor	3 ⁽⁵⁾	2 ⁽³⁸⁾	3	-	-	-	-	PL
18	Clor	3 ^(13,39)	2	NR	-	-	-	-	ID ⁽⁷⁾
		8 ^(13,39)	NR ⁽⁴⁰⁾	NR	-	-	-	-	PL ⁽⁶⁾

Os campos cor de laranja traduzem os *dropouts*; o 1.º campo cor de laranja na linha de um doente marca o momento a partir do qual esse doente foi considerado *dropout*. Os campos a verde marcam o período em que ocorreu o evento de interesse “cura citológica” na análise de Kaplan-Meier.

ABD – abdominal; AXI – axilar; Clor – clorexidina; Dc – dorso caudal; ID – interdigital; ING – inguinal; M – membro(s); NR – não registado; P – polihexanida; PL – perilabial; PN – perineal; PregasF – pregas faciais; TRX – tórax.

* T0 corresponde ao dia de inclusão no projeto; T1, T2, T3, T4, T5 e T6 correspondem, sensivelmente e respetivamente, à 1.^a, 2.^a, 3.^a, 4.^a, 5.^a e 6.^a semanas após inclusão.

** *Score* citológico ≠ 0, mas apenas bactérias extracelulares e/ou leveduras muito esporádicas (Anexo 15), o que de acordo com os critérios de diagnóstico para piodermite indica a cura citológica.

*** Suspende corticosteroide *per os* um dia depois, devido a polaquiúria.

(1) Descobertas lesões de piodermite profunda em ambas as coxas do doente, na região coxofemoral; recolha de amostra para cultura e TSA/CIM; faz mais uma semana de biocida nas lesões do dorso caudal, enquanto se aguarda o resultado da cultura; previsão de saída do projeto em T3, com início de antibioterapia adequada.

(2) Inicia antibiótico *per os* (minociclina) para piodermite profunda.

(3) Inicia ciclosporina.

(4) Suspende biocida.

(5) Inicia período de 3 a 5 dias de corticosteroide *per os* (prednisolona).

(6) Corresponde à Amostra 1 (Anexo 10).

(7) Corresponde à Amostra 2 (Anexo 10).

(8) Concomitante otite bacteriana; inicia preparação auricular com miconazol, gentamicina e hidrocortisona; inicia corticosteroide *per os* (prednisolona), a administrar de 5 em 5 dias; mitoxantrona administrada um dia depois da entrada no projeto.

(9) Doente retirada do projeto; inicia antibiótico *per os* (cefalexina).

(10) Concomitante otite por *Malassezia*; inicia preparação auricular com miconazol, polimixina B e prednisolona.

(11) Inicia antibiótico *per os* (amoxicilina/ácido clavulânico).

(12) Suspende biocida e inicia corticosteroide de uso tópico (aceponato de metilprednisolona).

(13) Inicia corticosteroide *per os* (prednisolona), até reavaliação.

(14) Desenvolve dermatite por *Malassezia*; inicia banhos semanais e lavagens diárias (ou dia sim, dia não) na região interdigital com champô de clorexidina e miconazol.

(15) Suspende corticosteroide *per os* (prednisolona).

(16) Suspende lavagens diárias nas patas e mantém banhos semanais com champô de clorexidina e miconazol.

(17) Doente retirada do projeto; inicia antifúngico *per os* (itraconazol) e tópico (clotrimazol).

(18) Inicia corticosteroide de uso tópico (aceponato de hidrocortisona).

(19) Suspende biocida; inicia pomada de palmitato de retinol intercalada com creme reparador à base de sucralfato, sulfato de cobre, sulfato de zinco e óxido de zinco; reduz dose de corticosteroide *per os* (prednisolona).

(20) Doente retirada do projeto; inicia antifúngico *per os* (itraconazol).

(21) Inicia biocida em lesões pustulares nas regiões abdominal e inguinal (T0 de 11b).

(22) Suspende biocida nas patas (T4 de 11a).

(23) Suposto início de corticosteroide de uso tópico (aceponato de hidrocortisona) nas patas, mas apenas efetuado durante um dia (T3 de 11b; T5 de 11a).

(24) Inicia corticosteroide de uso tópico (aceponato de hidrocortisona) em todas as patas (T4 de 11b; T6 de 11a).

(25) Retoma biocida na região interdigital devido a infeção por bactérias do tipo cocos.

(26) Suspende biocida na região interdigital (infeção resolvida); suspende aceponato de hidrocortisona e inicia outro corticosteroide de uso tópico (aceponato de metilprednisolona) na região interdigital.

(27) Suspende aceponato de hidrocortisona na região interdigital.

(28) Administração de imunoterapia.

(29) Interrompe ciclosporina 5 dias antes como consequência de diarreia intensa e inicia corticosteroide *per os* (prednisolona); mantém agora prednisolona, dia sim, dia não; retoma ciclosporina numa dose mais baixa e aumenta gradualmente ao longo das semanas seguintes.

(30) Concomitante otite mista; inicia preparação auricular com clotrimazol, marbofloxacin e dexametasona.

(31) Inicia trilostano na sequência de diagnóstico de hiperadrenocorticismismo adrenal-dependente; corticosteroide *per os* (prednisolona) apenas em SOS.

(32) Correção do protocolo de aplicação do tratamento: entre T0 e T1 fez o biocida BID, em vez de SID.

(33) Correção da dose e/ou protocolo de ciclosporina.

(34) Suspende preparação auricular; dois dias depois inicia nova preparação auricular com clorexidina e tris-EDTA.

(35) Iniciou corticosteroide de uso tópico (aceponato de metilprednisolona) três dias antes, na sequência de agravamento do prurido (grau 9/10) após interrupção de toda a medicação (ciclosporina e biocida) cinco dias antes; suspende agora metilprednisolona tópica; retoma ciclosporina e biocida.

(36) Inicia antibiótico *per os* (cefovecina).

(37) Ectoparasitas (pulgas) observados durante a consulta; prescrição de fluralaner pela via oral.

(38) Aumento da dose de corticosteroide *per os* (prednisolona).

(39) Inicia corticosteroide de uso tópico (aceponato de metilprednisolona) e tacrolimus nos pavilhões auriculares.

(40) Citologia não efetuada, porque o doente já não apresentava qualquer desconforto na região perilabial e a região também já não apresentava qualquer lesão, nem mesmo eritema; ainda assim, considerou-se que tinha ocorrido o evento de interesse para a análise da cura citológica segundo o método de Kaplan-Meier.

ANEXO 15 – Exame citológico (N=19).

N.º Grupo		Avaliação citológica segundo o método de Budach e Mueller (2012)																												Região											
		T0* (0d)					T1* (7±3d)					T2* (14±3d)					T3* (21±3d)					T4* (28±3d)					T5* (35±3d)					T6* (42±3d)									
		C	B	L	N	E	Mc	C	B	L	N	E	Mc	C	B	L	N	E	Mc	C	B	L	N	E	Mc	C	B	L	N		E	Mc	C	B	L	N	E	Mc			
1	Clor	0	3	0	0								0	0	0	0																						Dc			
2	Clor	3	4	2	2			1	1	0	1			0	0	0	0			-	-	-	-															PL**			
		1	2	0	1			1	1	1	0			0	0	0	0			-	-	-	-					0	0	0	0						ABD				
3	P	2	2	0	2			0	0	0	1																											ING**			
		1	0	0	1			0	0	0	0																										ID				
4	P	3	3	0	4			0	0	0	0								-	-	-	-			-	-	-	-					-	-	-	-		PL			
		1	0	0	1			0	0	0	0								2	2	0	2			-	-	-	-					-	-	-	-		ABD/ING**			
5	Clor	3	3	0	4			-	-	-	-			0	0	0	0			0	0	0	0			-	-	-	-									PL**			
		1	1	0	1			-	-	-	-			0	1	0	1			-	-	-	-			-	-	-	-								ID				
6	Clor	3	3	0	3								1	1	0	3			0	1	1	1			0	1	0	1			0	0	4	0			0	0	0	0	ID**
7	P	3	1	0	2																																	ID**			
8	P	0	2	2	1			-	-	-	-																											PL**			
		0	1	2	0			2	2	4	2																										ID				
		0	1	3	3			-	-	-	-																										PN				
9	Clor	3	1	1	2			0	0	0	0			0	2	0	0			0	0	2	0			-	-	-	-									ABD/ING**			
10	Clor	0	0	4	0			0	3	2	0			-	-	-	-																				Dc				
		0	1	4	0			0	4	2	4			0	0	4	0																				ABD				

(continua)

(conclusão)

N.º	Grupo	Avaliação citológica segundo o método de Budach e Mueller (2012)																														Região														
		T0* (0d)						T1* (7±3d)						T2* (14±3d)						T3* (21±3d)						T4* (28±3d)							T5* (35±3d)						T6* (42±3d)							
		C	B	L	N	E	Mc	C	B	L	N	E	Mc	C	B	L	N	E	Mc	C	B	L	N	E	Mc	C	B	L	N	E	Mc		C	B	L	N	E	Mc	C	B	L	N	E	Mc		
11a	P	2	2	3	4			0	1	0	0			0	0	1	0									0	0	0	0			0	0	0	0			0	0	3	0			ID		
11b	P	2	0	0	4	0	2							-	-	-	-			0	0	0	0			0	0	0	0			0	0	0	0			-	-	-	-			ABD/ING		
12	P	0	1	2	2			0	1	0	2			0	0	0	0			0	0	0	1			-	-	-	-			-	-	-	-			-	-	-	-			AXI**		
		1	0	3	2			2	0	0	2			0	0	0	0			-	-	-	-			-	-	-	-			-	-	-	-			-	-	-	-			PregasF		
13	Clor													1	1	1	2			0	0	0	0			3	0	0	4			0	0	0	0											ID
		2	0	0	3									0	0	0	2			1	0	0	2	0	1											0	0	2	3			ID**				
														2	0	0	4			2	0	0	4													1	0	0	4			ABD/ING				
14	Clor	1	1	0	1			0	0	0	0			0	0	0	0			-	-	-	-																						PN/M**	
15	P	2	2	0	4	1	1	0	1	0	0									0	0	0	0																						Cauda**	
16§	P	1	0	1	2									4	0	0	4	0	1	3	0	0	0			-	-	-	-			3	0	0	3			-	-	-	-			TRX**		
		0	0	1	0									-	-	-	-			-	-	-	-			-	-	-	-			-	-	-	-			-	-	-	-			M		
17	Clor	1	0	2	2			0	0	2	1			1	0	2	0																													PL
18	Clor	1	1	1	1			1	1	0	0			-	-	-	-																													ID**
		4	4	0	4			-	-	-	-			-	-	-	-																										PL			

Os campos a vermelho indicam a observação de bactérias intracelulares; o *score* sublinhado a observação adicional de bactérias extracelulares (EC). Os campos a amarelo indicam a observação exclusiva de bactérias EC. Para facilitar a leitura da tabela, as observações relativas aos eosinófilos e macrófagos foram ocultadas, exceto quando diferentes de zero.

ABD – abdominal; AXI – axilar; B – bastonetes; C – cocos; Clor – clorexidina; Dc – dorso caudal; E – eosinófilos; ID – interdigital; ING – inguinal; L – leveduras; M – membro(s); Mc – macrófagos; N – neutrófilos; P – polihexanida; PL – perilabial; PN – perineal; PregasF – pregas faciais; TRX – tórax.

* T0 corresponde ao dia de inclusão no projeto; T1, T2, T3, T4, T5 e T6 correspondem, sensivelmente e respetivamente, à 1.ª, 2.ª, 3.ª, 4.ª, 5.ª e 6.ª semanas após inclusão.

** Região de onde foi recolhida uma amostra para cultura bacteriana e TSA.

§ Doente n.º 16: a lâmina de T4 (destacada na tabela com sombreado cor de laranja) partiu-se antes de ser observada segundo o método de Budach e Mueller (2012) e não foi possível recuperar a amostra; por lapso, o resultado do exame citológico efetuado em consulta não ficou registado na ficha clínica.

ANEXO 16 – Progressão do grau prurido (N=19).

N.º	Grupo	Grau de prurido						
		T0*	T1*	T2*	T3*	T4*	T5*	T6*
		(0d)	(7±3d)	(14±3d)	(21±3d)	(28±3d)	(35±3d)	(42±3d)
1	Clor	4	-	2,5 ⁽¹⁾	-	-	-	2,5 ⁽²⁾
2	Clor	5	0	2 ⁽³⁾	NR ⁽⁴⁾	-	7 ⁽⁵⁾	-
3	P	9 ⁽⁶⁾	9 ⁽⁷⁾	-	-	-	-	-
4	P	9	3 ^(5,8)	-	7	7 ⁽⁹⁾	-	3
5	Clor	7,5 ⁽⁵⁾	4	7	6,5 ^(5,10)	2 ⁽⁵⁾	-	-
6	Clor	9 ⁽⁵⁾	-	7 ⁽¹¹⁾	5 ⁽³⁾	4 ⁽⁵⁾	8 ⁽¹⁰⁻¹²⁾	0 ^(13,14)
7	P	2	-	-	-	-	-	-
8	P	6 ⁽¹¹⁾	6 ^(15,16)	-	-	-	-	-
9	Clor	0	0	0	0 ⁽¹⁷⁾	0	-	-
10	Clor	8 ⁽⁵⁾	8	10 ⁽¹⁸⁾	-	-	NR	-
11a	P	8 ^{(5)**}	5 ^(3,8)	3 ⁽¹⁹⁾	-	3 ⁽⁴⁾	3 ⁽²¹⁾	3 ⁽²²⁾
11b	P	3	-	3 ⁽²⁰⁾	3 ^(4,21)	3 ^(22,23)	3 ^(23,24)	3 ^(23,25)
12	P	7 ⁽⁵⁾	7 ⁽³⁾	2	3 ^(4,16)	1 ^(5,24,26)	3 ⁽⁴⁾	-
13	Clor	6,5 ^(5,27)	-	5,5 ⁽²⁸⁾	6,5 ^(23,27,29)	-	-	4,5 ^(4,5,12,16)
14	Clor	5 ⁽³⁰⁾	4 ⁽³¹⁾	4	5 ⁽⁴⁾	-	-	-
15	P	7 ⁽³²⁾	NR ⁽³³⁾	- ⁽⁴⁾	NR ⁽³³⁾	-	-	-
16	P	7 ^(5,29,32)	-	2,5 ⁽³⁴⁾	3,5 ⁽³⁵⁾	NR	-	7 ^(4,36,37)
17	Clor	7 ⁽⁵⁾	4,5 ⁽³⁸⁾	5 ⁽³⁹⁾	-	-	-	-
18	Clor	8,5 ^(11,40)	2	1	-	-	-	-

Os campos cor de laranja traduzem os *dropouts*; o 1.º campo cor de laranja na linha de um doente marca o momento a partir do qual esse doente foi considerado *dropout*.

Clor – clorexidina; NR – não registado; P – polihexanida.

* T0 corresponde ao dia de inclusão no projeto; T1, T2, T3, T4, T5 e T6 correspondem, sensivelmente e respetivamente, à 1.ª, 2.ª, 3.ª, 4.ª, 5.ª e 6.ª semanas após inclusão.

** Suspende corticosteroide *per os* um dia depois, devido a polaquíúria.

⁽¹⁾ Descobertas lesões de piodermite profunda em ambas as coxas do doente, na região coxofemoral; recolha de amostra para cultura e TSA/CIM; faz mais uma semana de biocida nas lesões do dorso caudal, enquanto se aguarda o resultado da cultura; previsão de saída do projeto em T3, com início de antibioterapia adequada.

⁽²⁾ Inicia antibiótico *per os* (minociclina) para piodermite profunda.

⁽³⁾ Inicia ciclosporina.

⁽⁴⁾ Suspende biocida.

⁽⁵⁾ Inicia período de 3 a 5 dias de corticosteroide *per os* (prednisolona).

⁽⁶⁾ Concomitante otite bacteriana; inicia preparação auricular com miconazol, gentamicina e hidrocortisona; inicia corticosteroide *per os* (prednisolona), a administrar de 5 em 5 dias; mitoxantrona administrada um dia depois da entrada no projeto.

⁽⁷⁾ Doente retirada do projeto; inicia antibiótico *per os* (cefalexina).

⁽⁸⁾ Concomitante otite por *Malassezia*; inicia preparação auricular com miconazol, polimixina B e prednisolona.

⁽⁹⁾ Inicia antibiótico *per os* (amoxicilina/ácido clavulânico).

⁽¹⁰⁾ Suspende biocida e inicia corticosteroide de uso tópico (aceponato de metilprednisolona).

⁽¹¹⁾ Inicia corticosteroide *per os* (prednisolona), até reavaliação.

⁽¹²⁾ Desenvolve dermatite por *Malassezia*; inicia banhos semanais e lavagens diárias (ou dia sim, dia não) na região interdigital com champô de clorexidina e miconazol.

⁽¹³⁾ Suspende corticosteroide *per os* (prednisolona).

⁽¹⁴⁾ Suspende lavagens diárias nas patas e mantém banhos semanais com champô de clorexidina e miconazol.

- (15) Doente retirada do projeto; inicia antifúngico *per os* (itraconazol) e tópico (clotrimazol).
- (16) Inicia corticosteroide de uso tópico (aceponato de hidrocortisona).
- (17) Suspende biocida; inicia pomada de palmitato de retinol intercalada com creme reparador à base de sucralfato, sulfato de cobre, sulfato de zinco e óxido de zinco; reduz dose de corticosteroide *per os* (prednisolona).
- (18) Doente retirada do projeto; inicia antifúngico *per os* (itraconazol).
- (19) Inicia biocida em lesões pustulares nas regiões abdominal e inguinal (T0 de 11b).
- (20) Suspende biocida nas patas (T4 de 11a).
- (21) Suposto início de corticosteroide de uso tópico (aceponato de hidrocortisona) nas patas, mas apenas efetuado durante um dia (T3 de 11b; T5 de 11a).
- (22) Inicia corticosteroide de uso tópico (aceponato de hidrocortisona) em todas as patas (T4 de 11b; T6 de 11a).
- (23) Prurido apenas associado à região interdigital.
- (24) Retoma biocida na região interdigital devido a infecção por bactérias do tipo cocos.
- (25) Suspende biocida na região interdigital (infecção resolvida); suspende aceponato de hidrocortisona e inicia outro corticosteroide de uso tópico (aceponato de metilprednisolona) na região interdigital.
- (26) Suspende aceponato de hidrocortisona na região interdigital.
- (27) Administração de imunoterapia.
- (28) Interrompe ciclosporina 5 dias antes como consequência de diarreia intensa e inicia corticosteroide *per os* (prednisolona); mantém agora prednisolona, dia sim, dia não; retoma ciclosporina numa dose mais baixa e aumenta gradualmente ao longo das semanas seguintes.
- (29) Concomitante otite mista; inicia preparação auricular com clotrimazol, marbofloxacin e dexametasona.
- (30) Inicia trilostano na sequência de diagnóstico de hiperadrenocorticism adrenal-dependente; corticosteroide *per os* (prednisolona) apenas em SOS.
- (31) Correção do protocolo de aplicação do tratamento: entre T0 e T1 fez o biocida BID, em vez de SID.
- (32) Correção da dose e/ou protocolo de ciclosporina.
- (33) Não foi possível obter uma avaliação do grau de prurido.
- (34) Suspende preparação auricular; dois dias depois inicia nova preparação auricular com clorexidina e tris-EDTA.
- (35) Iniciou corticosteroide de uso tópico (aceponato de metilprednisolona) três dias antes, na sequência de agravamento do prurido (grau 9/10) após interrupção de toda a medicação (ciclosporina e biocida) cinco dias antes; suspende agora metilprednisolona tópica; retoma ciclosporina e biocida.
- (36) Inicia antibiótico *per os* (cefovecina).
- (37) Ectoparasitas (pulgas) observados durante a consulta; prescrição de fluralaner pela via oral.
- (38) Aumento da dose de corticosteroide *per os* (prednisolona).
- (39) Prurido essencialmente associado à região axilar (sem infecção; apenas inflamação).
- (40) Inicia corticosteroide de uso tópico (aceponato de metilprednisolona) e tacrolimus nos pavilhões auriculares.

ANEXO 17 – Estudo de casos: utilização do Prontosan® solução no tratamento tópico de dois doentes com granuloma acral por lambedura.

O granuloma acral por lambedura – dermatite acral por lambedura ou furunculose acral por lambedura – não é muito comum, tendo uma prevalência de 0,4% a 0,7% na população total de cães presentes a consulta de primeira opinião e de 2,3% a 2,9% nos cães presentes à consulta de referência de Dermatologia (Hill et al., 2006; Khoshnegah et al., 2013); pode ser muito difícil de resolver e envolve, na maioria das vezes, uma abordagem multimodal (Miller et al., 2013; Rosychuk, 2011). Como resultado do lamber excessivo, mais ou menos permanente, surgem “placas ou lesões nodulares circunscritas e firmes, alopecias, erodidas e/ou ulceradas”, geralmente na face dorsal de uma extremidade podal torácica, entre a região metacárpica e o cotovelo ou, menos comumente, numa extremidade podal pélvica, na região metatársica, do tarso ou da tíbia (Rosychuk, 2011). Com a cronicidade do processo, as lesões tendem a expandir para as áreas adjacentes (Miller et al., 2013). As raças Dobermann, Dogue Alemão, Retriever do Labrador, Setter Irlandês, Golden Retriever, Boxer, Weimaraner e Cão de Pastor Alemão parecem predispostas (Miller et al., 2013). Na origem destas lesões podem estar vários fatores: doença alérgica, como dermatite atópica ou hipersensibilidade alimentar, traumatismo, dor articular ou óssea, corpos estranhos, infeções fúngicas ou bacterianas, demodicose, neuropatia periférica, parestesia, neoplasias localizadas e problemas comportamentais. Estes doentes apresentam normalmente um comportamento obsessivo e é imprescindível não só determinar e resolver ou minimizar a(s) causa(s) da lesão, como também quebrar o ciclo do prurido e do comportamento de lamber para permitir a resolução da infeção e a cicatrização das lesões (Miller et al., 2013; Rosychuk, 2011). Na esmagadora maioria dos casos, as abordagens exclusivamente dermatológicas ou comportamentais são insuficientes para a resolução das lesões, o que justifica um plano terapêutico com múltiplas frentes de ação (Miller et al., 2013). A falta de interação social e de estímulos mentais, muitas vezes associadas a grandes períodos de solidão, bem como restrições de liberdade significativas, como é o caso de cães que passam a maior parte do tempo – ou todo o tempo – confinados em canis ou acorrentados podem levar a alterações psicológicas graves que se manifestam não só por um comportamento obsessivo que pode dar origem a estas lesões como também, muitas vezes, por outros comportamentos anormais para a espécie; é, por isso, raro que estas lesões surjam como manifestação exclusiva de problemas comportamentais e se na sua génese estão causas psicológicas é muito provável que se identifiquem outras alterações comportamentais (Miller et al., 2013; Rosychuk, 2011). Quando há suspeita de envolvimento psicogénico devem discutir-se primeiro quais as possíveis causas na base dessas alterações comportamentais e, depois, as potenciais formas de as corrigir,

havendo geralmente vários aspetos a melhor quer através de mudanças no estilo de vida quer por enriquecimento ambiental, devendo a abordagem ser específica para cada doente.

Com vista à quebra do ciclo vicioso instaurado devem introduzir-se medidas de restrição física, pelo menos na fase inicial do tratamento, o que pode incluir meias, ligaduras, açaimes e/ou colares isabelinos e similares (Miller et al., 2013; Rosychuk, 2011). Pode também ser necessário um período mais ou menos longo de fármacos psicoativos e, segundo Miller et al. (2013), os antidepressivos são os mais eficazes, designadamente a fluoxetina ou a clomipramina, embora possam também utilizar-se outros fármacos – potencialmente benéficos – como ansiolíticos, especialmente benzodiazepinas, por exemplo o diazepam ou o fenobarbital, anti-histamínicos sedativos, como a hidroxizina e antagonistas de opiáceos ou, em oposição, opiáceos exógenos, como a naltrexona ou a hidrocodona, respetivamente. Miller et al. (2013) mencionam ainda os progestagénios, que podem ser úteis devido ao seu “efeito calmante”, mas que, contudo, têm de ser administrados durante muitos meses e não devem ser usados em cadelas inteiras. Rosychuk (2011) utiliza mais frequentemente os antidepressivos já indicados e, por vezes, a amitriptilina, da mesma classe da clomipramina e que tem as vantagens de ser mais barata e melhor tolerada, mas que parece ser menos eficaz. O tratamento com antidepressivos é geralmente efetuado durante seis a oito semanas e deverá manter-se, em princípio, algumas semanas após a resolução da lesão (Rosychuk, 2011).

Se há evidências de doença alérgica – ou mesmo na falta delas, tendo em conta que esta é uma das causas mais comuns destas lesões e os donos podem simplesmente não se aperceber de outros sinais típicos – podem administrar-se glucocorticoides por via oral (Rosychuk, 2011). Os glucocorticoides de uso tópico também podem ser utilizados, mas serão mais úteis em lesões menos crónicas/graves. A administração intralesional de glucocorticoides pode ser favorável em lesões pequenas, mas segundo Miller et al. (2013) é inútil em lesões crónicas e extensas. Tanto Miller et al. (2013) como Rosychuk (2011) mencionam a aplicação tópica de uma mistura de capsaicina com uma solução de maçã amarga, duas a três vezes por dia, que tem o benefício da analgesia local associada a um cheiro e sabor desagradáveis que podem – como pretendido – levar a que o doente evite lamber a lesão, embora seja mais adequada numa fase igualmente mais precoce. Os antimicrobianos de uso tópico têm, na perspetiva de Miller et al. (2013), um benefício limitado, porque não permitem alcançar as zonas mais profundas da lesão. Deve, pois, iniciar-se antibioterapia adequada, de uso sistémico, preferencialmente confirmada por cultura e TSA, que a ser eficaz deverá ser mantida até algumas semanas após a resolução das lesões (Rosychuk, 2011).

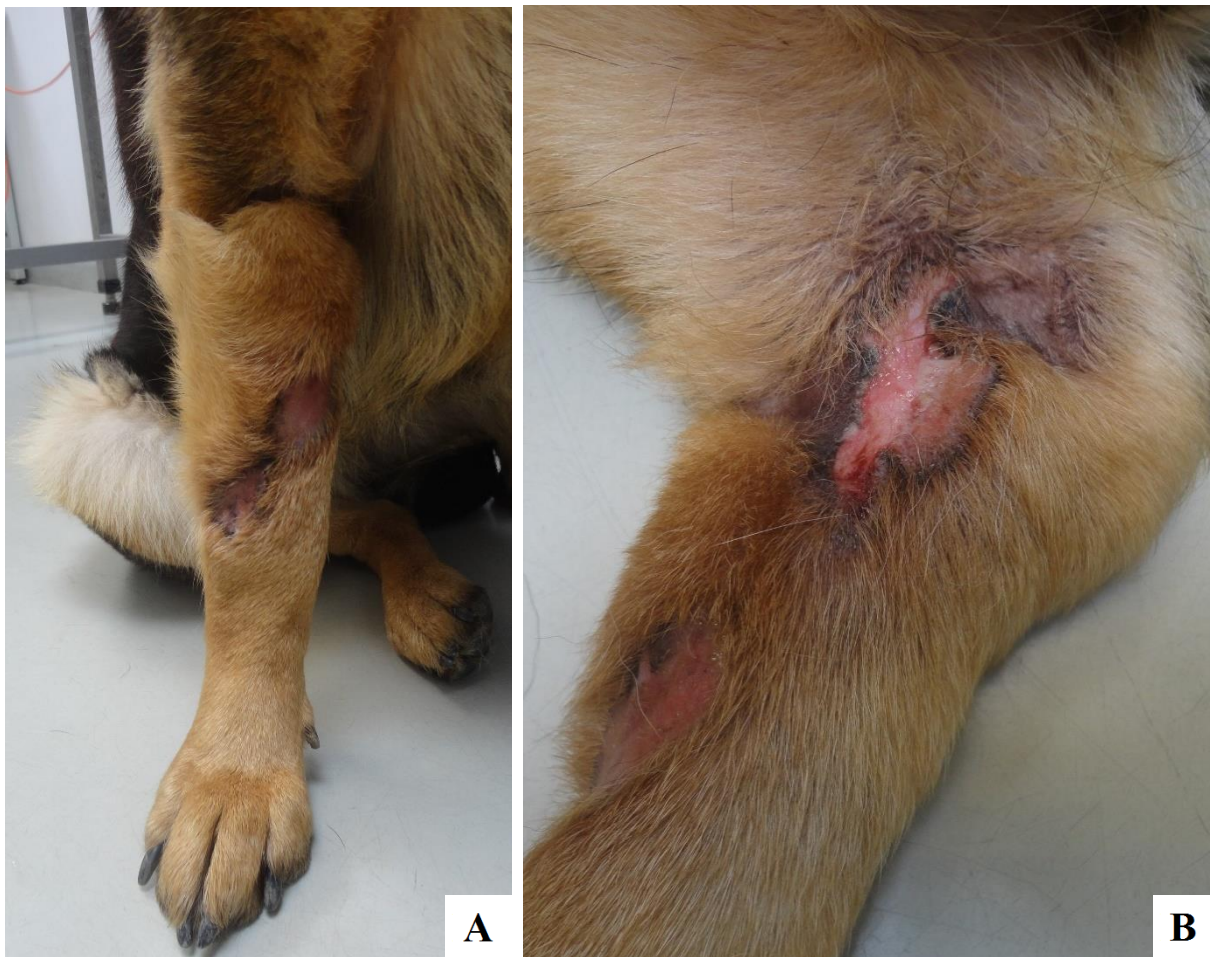
Por vezes, a remoção cirúrgica das lesões pode ser o tratamento mais adequado (Miller et al., 2013). Os autores mencionam ainda alternativas como a terapia com *laser*, a radioterapia – que

para lesões crônicas e extensas tem uma menor possibilidade de sucesso – e a criocirurgia, que é sobretudo utilizada como último recurso; a acupuntura pode também ter algum benefício.

Caso 1

Uma cadela com idade estimada de 3 anos, pertencente à raça Cão de Pastor Alemão, com 25 kg, apresentou-se à consulta de referência de Dermatologia para avaliação de uma ferida crônica no membro torácico direito, na face dorsal da região antebraquial e na face medial da região cubital. Na região antebraquial, a lesão surgia como uma placa de erosão, firme, em forma de oito, alopecica e eritematosa, com limites bem definidos, espessados e hiperpigmentados; a extensão da lesão para a região cubital assumia o aspeto de uma zona quadrangular, ulcerada, muito eritematosa e de bordos igualmente hiperpigmentados (Figura 35). Esta cadela tinha sido encontrada na rua havia 2 anos e já na altura tinha a mesma lesão, que se suspeitou ser de origem traumática numa armadilha destinada a espécies cinegéticas – suspeita que nunca se confirmou.

Figura 35 – Granuloma acral por lambedura no membro torácico direito (fotografias da autora).



A – lesão na região antebraquial dorsal; B – transição para a zona da lesão na região cubital medial.

Havia uma longa história de períodos de antibioterapia prolongada e, cinco meses antes, de uma tentativa de resolução cirúrgica, bem como de múltiplas tentativas de restrição física através de meias improvisadas com diversos materiais, açaimes de *nylon* e couro e colares isabelinos, todos eventualmente destruídos pela doente. O comportamento da doente em consulta denotava medo, ansiedade e submissão. Habitualmente estava confinada a um canil espaçoso num quintal privado e parecia ter havido algum esforço no sentido de aumentar a frequência dos passeios. A citologia cutânea foi efetuada por aposição direta e revelou sinais compatíveis com infeção por bactérias do tipo cocos; recolheu-se uma amostra para cultura bacteriana e TSA e foi ainda descartada a possibilidade de demodicose. O caráter crónico da situação, associado a um grande envolvimento emocional e a uma disponibilidade financeira reduzida desgastada pelo esforço de 2 anos e complicada pelo investimento cirúrgico, fez com que se ponderasse a utilização da polihexanida devido: 1) aos resultados de Medicina Humana com a utilização do Prontosan® no tratamento de feridas crónicas, infetadas; 2) ao facto de a participação no projeto significar um potencial benefício sem custos associados quer quanto ao produto de tratamento quer quanto às consultas de reavaliação, o que adicionalmente motivou as pessoas a prosseguirem com o tratamento, pois apesar de tudo pretendiam, sem dúvida, dar qualidade de vida à doente. Por isso, foi elaborado um plano inicialmente mais simples de restrição física com um colar cervical e a aplicação de polihexanida uma vez por dia através de discos desmaquilhantes impregnados com Prontosan® solução. Embora a existência de lesões ósseas/articulares não fosse muito provável, a falta de confirmação sobre prévios exames radiológicos levou a que se programasse essa investigação para a consulta 2 (Figura 36), não tendo sido detetada qualquer alteração.

Figura 36 – Intervalo de tempo (em n.º de dias) entre consultas de reavaliação; início do Prontosan® solução no dia da primeira consulta (consulta 1, indicada pela seta cor de laranja).



A tosquia terapêutica deveria ter sido realizada logo na primeira consulta, mas foi só efetuada na consulta 2, porque embora se tenha notado uma melhoria na região cubital (Figura 36), a ação do Prontosan® foi muito provavelmente mitigada e, portanto, menor comparativamente aos dias que se seguiram. Neste dia foi também iniciada terapêutica psicoativa com fluoxetina (uma cápsula de 20 mg/dia) e alprazolam (um comprimido de 0,5 mg, de doze em doze horas) e carprofeno (um comprimido de 100 mg, uma vez por dia). O resultado da cultura e TSA revelou um MRSP suscetível à amicacina, ao ácido fusídico, à fosfomicina, à enrofloxacina, à gentamicina, ao cloranfenicol e à minociclina e intermédio à clindamicina, à eritromicina e ao

trimetoprim/sulfametoxazol, mas o tratamento exclusivo com polihexanida foi mantido durante mais uma semana. Foi também estudada uma melhor forma de restrição física com a utilização de um colar isabelino feito de material mais resistente e reforçado com adesivo e discutiram-se várias opções de mudança de estilo de vida e de enriquecimento ambiental, sendo pedido um esforço acrescido durante, pelo menos, as duas a três semanas seguintes. A disponibilidade das pessoas responsáveis pela doente era muito reduzida, mas foi sugerido que, dentro do possível, aumentassem a frequência e a duração dos passeios e dos momentos de interação com pessoas e outros animais fora do canil; que tentassem estimular a doente com brinquedos que a pudessem distrair da sua obsessão, tendo sido apontados alguns dos mais adequados para cães com maior potencial destrutivo; que se ponderasse a introdução de outro cão na mesma *box*, que era espaçosa o suficiente para esse efeito, sendo o cão já conhecido da doente; e, em especial, que houvesse uma maior vigilância e globalmente a doente passasse mais tempo acompanhada. Na consulta 3 observou-se que a restrição física tinha sido eficaz para a região cubital, mas ineficaz para a região antebraquial, que a doente continuou a conseguir alcançar, pelo que a melhoria notória na região cubital não se observou na região antebraquial (Figura 37); introduziu-se minociclina na dose de 10 mg/kg, duas vezes por dia e o tratamento com Prontosan® foi prolongado como adjuvante. A dose de alprazolam começou a ser reduzida na consulta 4 e apesar de a consulta 5 ter sido programada para daí a uma semana, a doente só foi observada um mês depois (Figura 36). Durante esse mês, perdeu os 2 kg que tinha ganho no início do tratamento, portanto decidiu-se suspender a fluoxetina e iniciar amitriptilina (meio comprimido de 50 mg, duas vezes por dia; depois, um comprimido, uma vez por dia); foi ainda iniciado o desmame do alprazolam, previsto para ocorrer gradualmente ao longo de 3 semanas; e reforçou-se novamente a importância de alterar o estilo de vida da doente. O tratamento com minociclina e Prontosan® manteve-se inalterado. Todavia, a consulta 6 foi muito depois do previsto e a doente tinha piorado novamente (Figura 40) e, devido a problemas associados a deslocações tão frequentes e pouca disponibilidade, as pessoas responsáveis mostraram algum desânimo em relação ao futuro da doente. Assim, foi elaborado um plano terapêutico a ser enviado ao médico-veterinário que referiu a doente para que pudesse ser tratada mais perto de casa. Foi avaliada a hipótese de uma imobilização temporária do membro junto ao corpo, já que não se conseguia impedir que a doente alcançasse a região antebraquial, mas perdeu-se o seguimento durante muito tempo e veio a saber-se que não tinha havido grandes progressos. O caso desta doente veio mostrar a importância da implementação de estratégias para lidar com a vertente psicológica gravíssima potencialmente associada a estas lesões, que parece ter sido o fator perpetuante principal, já que a infeção resolveu e a lesão cicatrizou na região que a doente não conseguia alcançar.

Figura 37 – Granuloma acral por lambedura no membro torácico direito – progressão da lesão na região cubital, face medial (fotografias da autora).



A – apresentação à consulta; inicia aplicação diária de Prontosan® solução; B – a mesma zona 14 dias depois (consulta 2), antes da tosquia terapêutica.

Figura 38 – Mesma lesão da Figura 37 com a evolução do tratamento (fotografias da autora).



A – equivalente à imagem B da Figura 37, após tosquia terapêutica; B – (consulta 3) mesma zona uma semana depois, aos 21 dias de tratamento (tx) com o Prontosan® solução; inicia minociclina.

Figura 39 – Mesma lesão das Figuras 37 e 38 (fotografias da autora).



A – (consulta 4) aos 10 dias de tx com minociclina e 31 dias de tx com o Prontosan® solução; B – (consulta 5) aos 37 dias de tx com minociclina e 58 dias com o Prontosan® solução.

Figura 40 – Evolução muito desfavorável da lesão na região antebraquial (fotografia da autora).



Após 87 dias de tx com minociclina e 108 dias de tx com o Prontosan® solução. Não havia já qualquer esforço de minimizar o comportamento obsessivo da doente, que originou um grande aumento da área de lesão; na região cubital cicatrizou totalmente.

Caso 2

Um cão com 10 anos de idade, da raça Retriever do Labrador, com 37 kg, apresentou-se à consulta de referência de Dermatologia como última tentativa de recuperação de um granuloma acral por lambadura na perna direita antes da amputação desse membro. A lesão ocupava quase toda a face dorsal da região metatarsal e a região mais proximal dos dígitos e surgia como uma grande placa de zonas mais ou menos espessas e firmes, alopecica, de limites relativamente bem definidos, com uma grande região central ulcerada e pequenas erosões e úlceras espalhadas em redor; a zona central continha alguns detritos e sujidade e tinha limites muito eritematosos e parcialmente cobertos por material crostoso. Toda a pele estava tendencialmente hipopigmentada, na sequência de vários ciclos de cicatrização parcial e agravamento da lesão (Figura 41). Estava também presente uma lesão na região metatarsal do membro pélvico esquerdo, já cicatrizada, ocupando uma pequena área pouco acima dos dígitos, alopecica e hipopigmentada na sua zona central, ligeiramente eritematosa.

A lesão no membro pélvico direito tinha sido a primeira a surgir cerca de 2 anos antes, mas o doente apresentava, na altura, prurido em ambos os tarsos. Tinha já efetuado vários períodos de antibioterapia, incluindo com doxiciclina, ciprofloxacina e bacitracina de uso tópico e outros tratamentos sistémicos e tópicos, nomeadamente meloxicam, pentoxifilina, lavagens com champôs medicamentosos e ácidos gordos. Havia ainda história de otites recorrentes. A cultura mais recente efetuada noutro hospital tinha revelado *S. pseudintermedius*, *S. aureus* e *P. mirabilis*. O doente não tinha Leishmaniose.

Figura 41 – Granuloma acral por lambedura no membro pélvico direito (A e C) e lesão remanescente no membro pélvico esquerdo (B) (fotografias da autora).



Depois de uma conversa prolongada para identificar potenciais causas e fatores perpetuantes foi discutido e iniciado um plano terapêutico de resgate, que dada a complexidade e gravidade da situação se focou praticamente em todas as possíveis vertentes relevantes nestes casos e se baseou num regime de polifarmácia: o doente passou a utilizar um colar isabelino para restringir o acesso à lesão; iniciou-se terapêutica psicoativa com fluoxetina (2 comprimidos de 20 mg por dia numa toma única); acepromazina para sedação ligeira que coincidissem principalmente com os períodos em que o doente ficasse sozinho; e analgesia local, tendo sido dada a opção entre um creme de lidocaína/prilocaína e só lidocaína, devendo a lesão ser coberta por uma camada fina, duas a três vezes por dia; foi igualmente discutido o papel dos estímulos mentais e do exercício físico – dentro do possível de acordo com as limitações do doente – aumentando a frequência dos passeios e das brincadeiras e fazendo um enriquecimento ambiental através da utilização de brinquedos recomendados; iniciou-se ainda gabapentina para manejo terapêutico de uma eventual dor neuropática (1 comprimido de 600 mg de 12 em 12 horas); e ciclosporina numa dose baixa (1 ml de xarope com 100 mg/ml, uma vez por dia, que representa pouco mais do que metade da dose habitualmente utilizada de 5 mg/kg) para iniciar de forma muito precoce o manejo antialérgico, pois pela história uma componente alérgica era muito provável; foi ainda administrada prednisolona numa dose anti-inflamatória durante cinco dias. O doseamento das hormonas da tiroide não mostrou alterações. O exame citológico revelou infeção por bactérias do tipo cocos, tendo sido recolhida uma amostra para cultura e TSA. Entretanto iniciou-se tratamento com Prontosan® solução, como indicado anteriormente. Foi igualmente prescrita minociclina, mas por erro da farmácia o doente fez uma semana de tratamento com doxiciclina, pelo que só iniciou minociclina ao 8.º dia. Verificou-se uma progressão muito favorável em apenas 5 dias de tratamento (Figura 42) e ao 8.º dia a dose de gabapentina foi reduzida (1 comprimido de 24 em 24 horas); a fluoxetina foi suspensa, por lapso, mas retomada alguns dias depois; foi ainda recolhida uma amostra para análises hematológicas, que não revelaram alterações. Isolou-se um MRSP suscetível ao ácido fusídico, ao trimetoprim/sulfametoxazol, à minociclina e ao cloranfenicol e intermédio à enrofloxacina. Houve uma melhoria progressiva (Figura 43), tendo a gabapentina sido suspensa ao 15.º dia e a sedação com acepromazina e o creme analgésico ao 22.º dia do tratamento. A pessoa responsável pelo doente iniciou banhos de argila por iniciativa própria nesta última semana, o que pode ter contribuído para algum impasse no tratamento. Ao 29.º dia já não havia sinais de infeção, pelo que se interrompeu o Prontosan® e se iniciou a aplicação de vitamina A, duas vezes por dia, prolongando a administração de minociclina mais duas semanas. A estagiária não pôde estar presente nesta última consulta, portanto não há registo fotográfico da última semana de tratamento com o Prontosan®. Porém foram recebidas duas fotografias por correio eletrónico cerca de 10 meses

mais tarde, que mostram o progresso contínuo do doente (Figura 44), que recebeu, entretanto, o diagnóstico de displasia de anca.

Figura 42 – Granuloma acral por lambedura no membro pélvico direito – primeiros dias do tratamento (fotografias gentilmente cedidas pela pessoa responsável pelo doente).



A – 1 dia após o início do tx com Prontosan® solução; B – 5 dias após o início do tx.

Figura 43 – Granuloma acral por lambedura no membro pélvico direito – evolução ao longo das primeiras três semanas de tratamento (fotografias da autora).



A – aos 8 dias de tx com Prontosan® solução; B – aos 15 dias de tx; C – aos 22 dias de tx.

Figura 44 – Granuloma acral por lambedura no membro pélvico direito – cerca de 10 meses após o término do Prontosan® solução (fotografias gentilmente cedidas pela pessoa responsável pelo doente).



Em suma, considera-se que o Prontosan® solução foi importante para a favorável progressão clínica observada no doente 2 e, inicialmente, na doente 1. No caso da doente 1, o tratamento com Prontosan® foi inicialmente exclusivo, pelo que se poderá atribuir a melhoria observada a alguns dos seus efeitos. A correta implementação das recomendações de mudança de estilo de vida, com reforço de passeios e brincadeiras e interação social no caso da doente 1 teria, muito provavelmente, resultado num desfecho diferente. No caso do doente 2, o Prontosan® pode ter contribuído para a grande evolução observada, mas é impossível medir essa contribuição tendo em conta o plano tão intensivo de polifarmácia. Será interessante, no futuro, explorar o papel deste antisséptico e, em particular, do Prontosan® como adjuvante no tratamento deste tipo de infeções e de outras infeções profundas da pele, em especial quando a situação é tantas vezes complicada de gerir. Adicionalmente, está em aberto a sua utilização no tratamento de outras feridas, tal como acontece em Medicina Humana.